

EIN BEITRAG ZUR KENNTNIS DER STRUKTUR
VON D-OXYNITRILASE-ISOENZYMEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

dem Fachbereich Chemie
der

Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

VOLKER MÄTZKE

aus Kassel

Marburg/Lahn 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

EIN BEITRAG ZUR KENNTNIS DER STRUKTUR
VON D-OXYNITRILASE-ISOENZYMEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

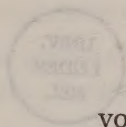
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

dem Fachbereich Chemie

der

Philipps-Universität Marburg/Lahn



von

VOLKER MÄTZKE

aus Kassel

Marburg/Lahn 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität
Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 20. 6. 1977
Tag der mündlichen Prüfung am 6. 7. 1977

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Pfeil
Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Follmann

Inhaltsverzeichnis

I	<u>Allgemeiner Teil</u>	Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Das Enzym D-Oxynitrilase	1
1.2	Zur Nomenklatur	5
2.	Darstellung von S-carboxymethyliertem Apoprotein	8
2.1	Darstellung und Reinigung von Mandel-D-Oxynitrilase	8
2.2	Trennung der Isoenzyme	9
2.3	Spaltung und Denaturierung der Isoenzyme	9
2.4	Reduktive Spaltung der Disulfidbrücken und S-Carboxymethylierung	10
3.	Spaltung von S-carboxymethyliertem D-Oxynitrilase-Apoprotein	11
3.1	Tryptische und chymotryptische Spaltung und Versuche zur Trennung der Peptide	11
3.2	Bromcyanspaltung und analytische Trennung der Peptide	11
3.3	Nachweis der Spaltung durch Gefrier-trocknung	13
4.	Charakterisierung von Isoenzymen und Peptiden	28
4.1	Molmassenbestimmung der Peptide	28
4.2	Quantitative Bestimmung der Peptidfraktionen in S-carboxymethyliertem Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzym II -Apoprotein	32

4.3	Vergleich der Peptidmuster von gefriergetrocknetem mit S-carboxymethyliertem Apoprotein von Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzym II	35
4.4	Vergleich der Peptidmuster von Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzym I und II	38
4.5	Vergleich der gefriergetrockneten und S-carboxymethylierten D-Oxynitrilase-Apoproteine von Mandel-Isoenzym II und Apfel-Isoenzym I	41
4.6	Aminosäurenanalysen der Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzyme I, II und III	42
4.7	Aminosäurenanalysen der S-carboxymethylierten Peptide von Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzym II	47
5	Präparative Trennung der Peptide	50
5.1	Chromatographie der Peptide an Dextrangel	50
5.2	Trennung der Peptide an Controlled Pore Glass	55
5.3	Präparative Trennung der S-carboxymethylierten Peptide durch kontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	56
5.3.1	Trennverfahren	56
5.3.2	Identifizierung und Wiedergewinnung der Peptide	56
5.3.3	Elution der Peptide aus Polyacrylamid-Gel	58
6.	Diskussion	59
7.	Zusammenfassung	64

II Experimenteller Teil

1.	Darstellung von Mandel- und Apfel-D-Oxynitrilase	66
1.1	Ausgangsmaterial	66
1.2	Extraktion der Enzyme	66
1.3	Chromatographie an SEPHADEX G-100	67
1.4	Trennung der Isoenzyme	68
1.5	Spaltung der D-Oxynitrilase-Isoenzyme nach STRITTMATTER	69
1.6	Aktivitätsbestimmung durch den wässrigen Drehtest	70
2.	Darstellung von reduziertem und S-carboxymethyliertem Apoprotein	71
2.1	Bestimmung freier SH-Gruppen	71
2.2	Reduktion und S-Carboxymethylierung des Apoproteins	72
3.	Spaltung von S-carboxymethyliertem Apoprotein mit Bromcyan	73
4.	Analytische und präparative Peptidtrennung	74
4.1	Chromatographie an SEPHADEX G-100	74
4.2	Kontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen und Peptiden	75
4.2.1	Präparation der Protein- und Peptidlösungen	75
4.2.2	Präparation des SDS-Polyacrylamid-Gels	76
4.2.3	Durchführung der Elektrophorese	78

4.2.4	Fixierung und Färbung	79
4.2.5	Auswertung	80
4.2.6	Färbung von Proteinen und Peptiden mit Fluoreszenzfarbstoff	81
4.3	Präparative Peptidtrennung durch kontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	82
4.3.1	Trennungungsverfahren	82
4.3.2	Identifizierung der Peptidbanden	83
4.3.3	Elution der Peptide	83
5.	Quantitative Aminosäurenanalyse	84
5.1	Saure Hydrolyse	85
5.2	Chromatographie	85
5.3	Auswertung	86
III	<u>Literaturverzeichnis</u>	91

I Allgemeiner Teil

1. Einleitung

1.1 Das Enzym D-Oxynitrilase

Im Jahre 1908 entdeckte L.ROSENTHALER¹⁾ im Emulsin aus bitteren Mandeln ein gelbes Ferment, das aus Benzaldehyd und Blausäure rechtsdrehendes Mandelsäurenitril synthetisiert. Er nannte es Oxynitrilase und konnte in umfangreichen Untersuchungen zeigen, daß das Enzym auch in den Samen, Früchten, Sprossen und Blättern anderer Pflanzen vorkommt.

E.NORDEFELDT²⁾ und H.ALBERS³⁾ studierten die Eigenschaften der Oxynitrilase und bemühten sich um eine Verbesserung der Enzympräparate.

U.BENTHIN⁴⁾ und E.ESCHENHOF⁵⁾ arbeiteten an einer Verbesserung der Reinigungsverfahren. Die Verwendung von Cellulose-Austauschern und Gelfiltration an SEPHADEX führte zu hochaktiven Enzympräparaten, die sich aber weder in der Ultrazentrifuge noch in der TISELIUS-Elektrophorese als rein erwiesen.

W.BECKER⁶⁾ konnte durch Verfeinerung des Reinigungsverfahrens Präparate gewinnen, die in der Ultrazentrifuge, der TISELIUS-Elektrophorese und in Agar-Diffusionstests mit Kaninchen-Antiserum einheitlich waren. Als prosthetische Gruppe wurde FAD ermittelt, das Absorptionsspektrum ist ein "hydrophobes" Flavinspektrum. Als Trivialname wurde die Bezeichnung D-Oxynitrilase zur Kennzeichnung der Stereospezifität des Enzyms eingeführt.

E.GERSTNER⁷⁾ konnte D-Oxynitrilasen verschiedener Prunusarten rein darstellen und ihre Eigenschaften beschreiben. Er fand Unterschiede besonders in Hin-

blick auf die elektrophoretische Beweglichkeit der verschiedenen Enzyme.

Die wichtigsten Eigenschaften der Mandel-D-Oxynitrilase wurden von W.BECKER und E.PFEIL⁸⁾ beschrieben. Den Autoren ist die Spaltung des Enzyms in FAD und Apoprotein (STRITTMATTER-Verfahren) sowie die Re-synthese zum aktiven Holoenzym gelungen.

E.GERSTNER⁹⁾ und ich¹⁰⁾ untersuchten die Verbreitung der D-Oxynitrilasen in der Familie der Rosaceen, das Enzym kommt in allen Pflanzenarten der Unterfamilien Maloideae und Prunoideae, nicht aber in Spiraeoideae und Rosoideae vor. Wir stellten das Enzym aus verschiedenen Prunoideen und Pomoideen rein dar und konnten wesentliche Eigenschaften beschreiben.

In der Polyacrylamidgel-Disc-Elektrophorese erwies sich die Mandel-D-Oxynitrilase als nicht einheitlich. Dieses Ergebnis von M.MANTEL¹¹⁾ führte zu einer systematischen disk-elektrophoretischen Untersuchung der artspezifischen Enzyme. Ich¹⁰⁾ konnte nachweisen, daß die D-Oxynitrilasen aller Prunoideen und Pomoideen aus mehreren Isoenzymen bestehen. Jede Art besitzt ein eigenes, konstantes Isoenzym-Muster, das auch in genetisch einheitlichem Material - die Enzyme wurden aus einzelnen Samen isoliert - vorliegt.

H-J.ASCHHOFF¹²⁾ entwickelte ein Verfahren zur präparativen Trennung der drei Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzyme an DEAE-Cellulose-Austauscher und beschrieb ihre wichtigsten Eigenschaften.

E.GERSTNER führte weitere Arbeiten zur Trennung und Charakterisierung von D-Oxynitrilase-Isoenzymen aus verschiedenen Rosaceen durch. Seine Versuche zum immunologischen Verhalten der Isoenzyme zeigten, daß

die Enzyme innerhalb der Unterfamilien hinsichtlich Struktur und determinanten Gruppen weitgehend identisch sind, zwischen den Unterfamilien aber strukturelle Unterschiede vorliegen, die in der Immunelektrophorese und im OUCHTERLONY-Geldiffusionstest nachweisbar sind. Weiterhin gelang die Charakterisierung von Isoenzymen durch Fingerprint-Analyse der tryptischen Peptide. Diese Versuche wurden von I.STEINER¹³⁾ und R.WAGNER¹⁴⁾ mit dem Ziel einer präparativen Trennung tryptischer und chymotryptischer Peptide fortgesetzt.

F.KROMBHOLZ¹⁵⁾ und G.HAAS¹⁶⁾ bestimmten die Zuckerkomponenten und -bindung in D-Oxynitrilase-Apoproteinen von *Prunus amygdalus*. Der Gesamtzuckergehalt beträgt $2,8 \pm 0,5$ %, die Anteile der nachgewiesenen Hexosen Glucose und Galaktose stehen im Verhältnis 2 : 1. Die isolierten Glycopeptide enthalten wahrscheinlich dreigliedrige Kohlenhydratketten, die O-glycosidisch über die halbacetale OH-Gruppe von Galaktose an die Hydroxyaminosäuren Serin und Threonin gebunden sind.

Die letztgenannten Arbeiten zeigen, daß nach Vervollkommen von Reinigung und Charakterisierung der D-Oxynitrilasen die Aufklärung der Enzymstruktur das angestrebte Ziel ist. Diese Zusammenfassung berücksichtigt nur Arbeiten, die die Voraussetzungen für ein Eindringen in die Molekülstruktur geschaffen haben.

Aufgrund der relativ hohen Molekülmasse und der Aminosäurezusammensetzung des Enzyms liefern enzymatische Spaltungen eine große Zahl von Peptiden, was Trennung und Einordnung in die Struktur erschwert. Die Isolierung einzelner, reiner Peptide in geringer Menge gelingt durch Kombination von Chromatographie und Hoch-

spannungselektrophorese auf Dünnschichtplatten, die Isolierung von Glycopeptiden auch durch Chromatographie an SEPHADEX G-25 mit 0,1 N Essigsäure¹⁶⁾.

Aufgabe dieser Arbeit ist die Darstellung, Trennung und Charakterisierung weniger, großer, reproduzierbarer Polypeptide aus dem Apoprotein von D-Oxynitri-lase, die enzymatisch weiter gespalten werden können. Auf diesem Wege sollen die enzymatischen Hydrolysen der Polypeptide eine jeweils geringere Zahl von kleineren Peptiden liefern, deren präparative Trennung durch Säulenchromatographie und an Ionen-austauschern möglich ist. Die Bestimmung der Amino-säuresequenz dieser Peptide und ihre Einordnung in die Primärstruktur des Proteins können die Ziele weiterer Arbeiten sein.

Die durch analytische und präparative Methoden getrennten Spaltprodukte sollen der Charakterisierung und dem Vergleich der Mandel-D-Oxynitriylase-Isoenzyme selbst und zusammen mit Aminosäureanalysen der Untersuchung ihrer strukturellen Unterschiede dienen.

In der vorliegenden Dissertation beschreibe ich Versuche zur Denaturierung und Spaltung der D-Oxynitri-lase. Die systematische Untersuchung der Bromcyan-spaltung führt zu der Entdeckung, daß eine Gefrier-trocknung des Apoproteins nach Ablösung des FAD eine partielle saure Hydrolyse bewirkt. Durch Säulenchromatographie, besonders aber durch die kontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, gelingen analytische und präparative Trennung der Spaltprodukte und ihre Charakterisierung. Ein Vergleich der Elektropherogramme und Aminosäureanalysen erlaubt einen strukturellen Vergleich der Isoenzyme.

1.2 Zur Nomenklatur

Das Enzym D-Oxynitrilase trägt den systematischen Namen Mandelsäurenitril Benzaldehyd-Lyase (Abkürzung: Hydroxynitril-Lyase) und wird mit der Nummer E.C. 4.1.2.10 geführt. Im folgenden Text wird weiter der Trivialname verwandt. W.BECKER und E.PFEIL⁸⁾ empfahlen die Bezeichnung D- α -Hydroxynitril-Aldehyd-Lyase, da das Enzym nicht absolut substratspezifisch, andererseits aber in seiner katalytischen Wirkung stereospezifisch ist. Diese Eigenschaften werden auch in der neuen Nomenklatur nicht berücksichtigt.

Die artspezifischen Isoenzyme jeder D-Oxynitrilase lösen sich, mit einer Ausnahme von *Prunus avium*, bei der präparativen Trennung an DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher entgegengesetzt zu ihrer Beweglichkeit in der Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese vom Austauscher ab. Das Isoenzym mit der größten elektrophoretischen Beweglichkeit bewegt sich also bei der Elution am langsamsten.

Bei der Kennzeichnung der Isoenzyme durch H-J.ASCHHOFF¹²⁾ wurden die Vorschläge von T.WIELAND und G.PFLEIDERER¹⁷⁾ zur Numerierung entsprechend der elektrophoretischen Beweglichkeit, wonach das am schnellsten zur Anode wandernde Isoenzym die Nummer 1 erhalten soll, nicht befolgt. ASCHHOFF hat die Isoenzyme nach der Reihenfolge ihrer Ablösung vom Ionenaustauscher numeriert, sodaß sich eine Umkehr der heute üblichen Kennzeichnung ergibt.

Die IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN) ist in ihren Empfehlungen zur Nomenklatur multipler Enzymformen¹⁸⁾ dem Vorschlag zur Numerierung nach der größten anodischen Beweglichkeit gefolgt.

Abbildung 1 auf der folgenden Seite zeigt ein Pherogramm der Polyacrylamid-Disc-Gelelektrophorese mit densitometrischer Vermessung von dreimal an SEPHADEX G-100 chromatographierter Mandel-D-Oxynitrilase.

Diese Methode liefert eine saubere analytische Trennung der Isoenzyme, deren Numerierung den Empfehlungen der IUPAC-Kommission folgt. Gegenüber früheren Arbeiten kehrt sich damit die Reihenfolge der Isoenzyme um.

In dieser Arbeit findet zur analytischen und präparativen Peptidtrennung besonders die kontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese Anwendung; die Kennzeichnung der Peptide erfolgt ebenfalls nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit, wobei das am schnellsten zur Anode wandernde Peptid die Nummer 1 erhält.

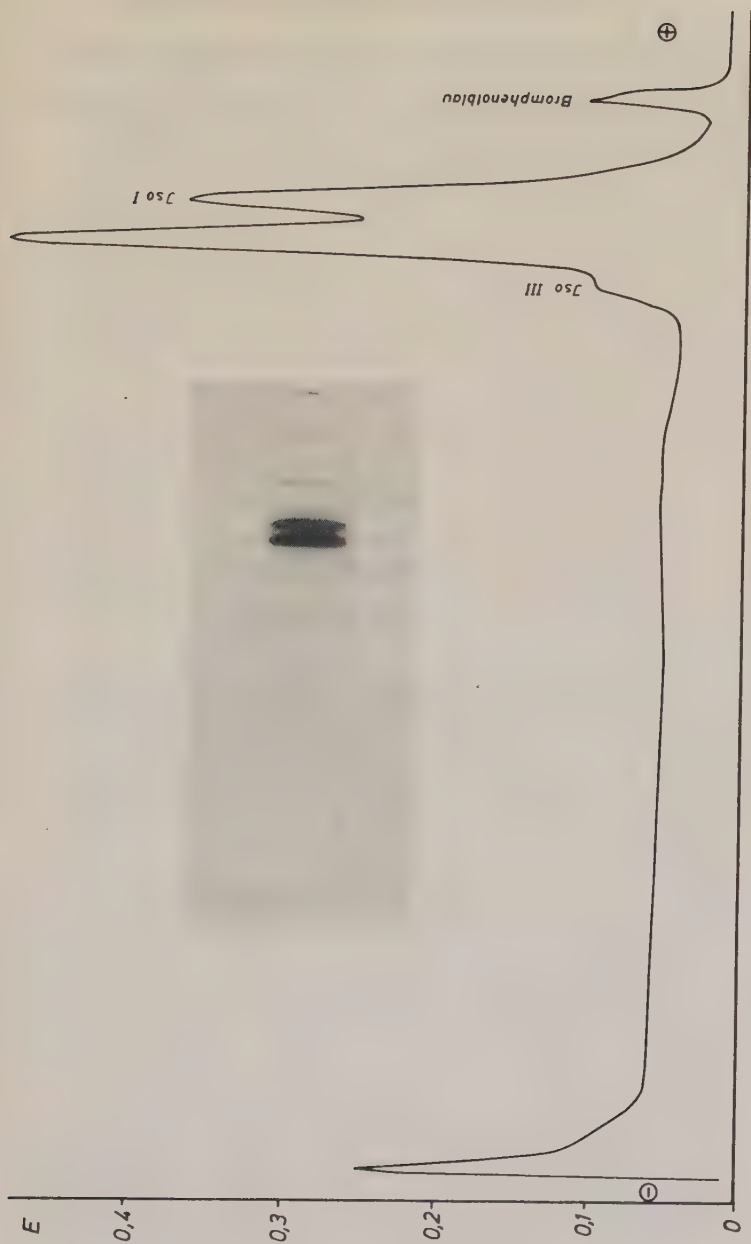


Abb. 1

Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzyme,
 Pherogramm und densitometrische Vermessung der Disk-Elektrophorese
 (3 x an SEPHADEX G-100 chromatographiert, Spuren von β -Glucosidase)

2. Darstellung von S-carboxymethyliertem Apoprotein

2.1 Darstellung und Reinigung von Mandel-D-Oxynitrilase

Die Reindarstellung der Mandel-D-Oxynitrilase erfolgt nach dem modifizierten Verfahren von K.H.MEHNER¹⁹⁾. Mandelkleie wird mit der zehnfachen Menge von verdünntem Ammoniak pH 7,5 12 Stunden extrahiert. Wegen der löslichen Gerbsäuren ist eine öftere Korrektur des pH-Wertes erforderlich. Nach dem Zentrifugieren folgt eine Fällung inaktiver Begleitproteine aus dem Rohextrakt durch Einstellen auf pH 5,4 mit 6 N Essigsäure.

Die Einengung des Zentrifugats durch Ultrafiltration ergibt eine ankonzentrierte braungelbe Lösung, die neben D-Oxynitrilase weitere Enzyme wie Phosphatase und β -Glucosidase enthält. Der von MEHNER beschriebene Reinigungseffekt ist, wie eigene Untersuchungen ergaben, nur unbedeutend, der Aktivitätsverlust ist erheblich.

Nach Konzentrierung des Extrakts folgt direkt die Gel-filtration auf 2 m langen Säulen an SEPHADEX G-100, äquilibriert mit 0,1 M Pyrophosphatpuffer pH 7,5 . 2 - 4-malige Gelfiltration ist je nach gewünschtem Reinheitsgrad nötig.

Präparate für den Einsatz in der Isoenzymtrennung werden zur Erhöhung der Ausbeute nur dreimal gelfiltrierte, da die Trennung am Cellulose-Austauscher mit einem erheblichen Reinigungseffekt verbunden ist, und danach in der Disc-Elektrophorese keine Verunreinigungen mehr nachweisbar sind.

Zur zwischenzeitlichen Aufbewahrung oder Konzentrierung des Enzyms hat sich die Ausfällung mit Ammoniumsulfat bewährt. Unter gesättigter Lösung dieses Salzes hält sich die D-Oxynitrilase lange Zeit ohne Aktivitätsverlust im Kühlschrank.

2.2 Trennung der Isoenzyme

Die Fraktionierung der Isoenzyme gelingt nach der von ASCHHOFF¹²⁾ beschriebenen Methode durch Chromatographie an DEAE-Cellulose-Austauscher. Das salzfreie Enzymgemisch, gelöst in 0,01 M Phosphatpuffer pH 6,0, wird auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Austauschersäule aufgetragen. Elution erfolgt mit einem logarithmischen Phosphatgradienten, 0,01 - 0,15 M bei pH 6,0. Den Säulenquerschnitt habe ich zur Erhöhung des Durchsatzes auf 2,5 cm erhöht, die Säulenlänge auf 25 cm verkürzt, da durch eine längere Säule keine bessere Trennung erreichbar ist. Um einen gleichermaßen flachen Anstieg des Gradienten zu erzielen, muß das Volumen des 0,01 M Phosphatpuffers im Mischgefäß 2250 ml betragen.

2.3 Spaltung und Denaturierung der Isoenzyme

Zur Spaltung der D-Oxynitrilase in Apoprotein und Coenzym gehe ich nach der schonenden Methode von P.STRITTMATTER²⁰⁾ vor. Da FAD am Apoprotein nicht kovalent gebunden ist, löst es sich bei diesem Verfahren in nur schwach saurer Ammoniumsulfatlösung (pH 2,2) durch Zusatz von KBr-Lösung vom Protein ab. Die Durchführung der Spaltung bei 0 - 2°C vermindert Aggregation, und die Möglichkeit zur Resynthese von aktivem Enzym zeigt die Vorteile dieser Methode. Die wesentlich einfachere Spaltung mit 1 - 2 N Mineralsäure¹²⁾ ist zu vermeiden, da hierbei eine saure Hydrolyse einzelner Peptidbindungen auftreten kann. Hitzedenaturierung¹⁶⁾ führt zu Aggregationen des Apoproteins, die durch 8 M Harnstofflösung und selbst 1 % Natriumdodecylsulfatlösung (SDS) nur teilweise wieder löslich sind. Die folgende Abbildung 2 zeigt einen Vergleich von hitzedenaturiertem und von nativem Apoprotein von Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzym II. Bei hitzedenaturiertem Material treten neben den Aggregaten auch geringe Mengen von Spaltprodukten auf.

Abb. 2

Pherogramme von Mandel-
D-Oxynitrilase-Isoenzym II
links hitzedenaturiertes
Apoprotein; rechts natives
Apoprotein nach STRITTMATTER

2.4 Reduktive Spaltung der Disulfidbrücken und S-Carboxy-
methylierung

Freie SH-Gruppen konnten nach der Methode von NEUMANN²¹⁾ mit p-Hydroxymercuribenzoat (PMB) weder im Holoenzym noch im Apoprotein nachgewiesen werden.

Das vorhandene Cystein muß demnach als Cystin vorliegen. Die reduktive Spaltung der Disulfidbrücken wird nach der Methode von CRESTFIELD, MOORE und STEIN²²⁾ mit Mercapto-äthanol in Trispuffer vom pH 8,6 durchgeführt.

Die S-Carboxymethylierung erfolgt durch Jodessigsäure. Nach Gelfiltration an Sephadex G 25 in 50 % Essigsäure wird das reduzierte und alkylierte Protein gefriergetrocknet und kann gekühlt aufbewahrt werden.

3. Spaltung von S-carboxymethyliertem D-Oxynitrilase-Apoprotein

3.1 Tryptische und chymotryptische Spaltung und Versuche zur Trennung der Peptide

Die enzymatischen Spaltungen der Apoproteine mit Trypsin und Chymotrypsin schließen an die Versuche von GERSTNER⁷⁾ an. Das eingesetzte Trypsin ist zur Vermeidung chymotryptischer Aktivität nach S.WANG und F. H. CARPENTER²³⁾ mit TPCK (N-Tosyl-L-phenylalanyl-chlor-methyl-keton) behandelt.

Die präparativen Methoden zur Peptidtrennung nach R.E. CANFIELD²⁴⁾ und J.R.KIMMEL²⁵⁾ an Phosphozellulose unter Einsatz flüchtiger Puffer nach G.BRAUNITZER²⁶⁾ und nach J.V.BENSON et al.²⁷⁾ an sulfoniertem Polystyrolharz erwiesen sich aufgrund der hohen Peptidzahl und der verschmierten Elution der Peptide, bedingt durch zu starke Haftung an den Austauschern, als ungeeignet, sodaß zur Trennung der Peptide weiterhin auf die Kombination von Chromatographie und Elektrophorese auf Dünnschichtplatten zurückgegriffen werden muß.

Aufgrund dieser Ergebnisse galt es, eine verringerte Peptidzahl durch Verminderung der Spaltstellen zu erzielen. Neben der Maskierung der ϵ -Aminogruppen von Lysin bot sich die Spaltung mit Bromcyan an den Methioninresten nach E.GROSS und B.WITKOP²⁸⁾ an. Der geringe Methioningehalt von Mandel-D-Oxynitrilase ließ ein positives Ergebnis erwarten.

3.2 Bromcyanspaltung und analytische Trennung der Peptide

Die Bromcyanspaltung führe ich nach der Methode von C.B.ANFINSEN²⁹⁾ in 70 % Ameisensäure bei Zimmertemperatur mit einem 80-fachen Überschuß an Bromcyan, bezogen auf die Methioninreste, durch. Eine Spaltung tritt selektiv an Peptidbindungen ein, die die Carb-

oxylgruppe von Methionin enthalten. Diese Aminosäure geht dabei überwiegend in Homoserin über.

Die Bromcyanpeptide sind nach der Gefriertrocknung aufgrund leichter Flüchtigkeit von Ameisensäure und Bromcyan gereinigt und gekühlt haltbar.

Die Spaltprodukte lösen sich nicht in Puffern ohne Detergentienzusatz oder hohe Protonenkonzentration, damit ist eine analytische Trennung durch Chromatographie und Hochspannungselektrophorese auf Papier oder Dünnschichtplatten unmöglich.

Als brauchbar erweist sich die kontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dabei wird die von K.WEBER und M.OSBORN³⁰⁾ zur Molekulargewichtsbestimmung eingeführte Methode vereinfacht, da die Inkubation der carb-oxymethylierten Präparate mit 1 % Mercaptoäthanollösung und anschließender Dialyse nicht erforderlich ist.

Pherogramme von Trennungen der Bromcyanpeptide zeigen eine gute Auftrennung des Materials in 9 Peptide (6 kräftige, 3 schwache Banden), die die erfolgreiche Spaltung des Apoproteins deutlich machen. Da die Reaktion und auch die Gefriertrocknung in 70 % Ameisensäure abläuft, kann aber auch eine partielle saure Hydrolyse für die Spaltung einiger Peptidbindungen verantwortlich sein.



Abb. 3

Pherogramm der Bromcyanpeptide von Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzym II

3.3 Nachweis der Spaltung des Apoproteins durch Gefrier Trocknung

Aufgrund der guten analytischen Trennung der Bromcyan-peptide wurden auch die Ausgangsmaterialien der Bromcyan-spaltung, S-carboxymethyliertes Apoprotein, natives und gefriergetrocknetes Apoprotein und natives und gefriergetrocknetes Holoenzym auf ihr Verhalten in der kontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht.

S-Carboxymethyliertes Apoprotein wird bei dieser Methode in 11 Peptidbanden aufgetrennt, das Bandenmuster zeigt teilweise Übereinstimmung mit den Bromcyanpeptiden. Im hochmolekularen Bereich fehlen zwei Banden - hier wird offensichtlich durch Bromcyan gespalten.

Dieses Ergebnis zeigt, daß der Spalteffekt durch Bromcyan nicht sehr groß ist und daß das Protein schon vorher gespalten wurde. Bei der Reduktion und Alkylierung wird das Apoprotein in 50 % Essigsäure chromatographiert und aus dieser Lösung gefriergetrocknet, bei der Spaltung nach STRITTMATTER wird das Enzym bis nahe an pH 2 angesäuert. Eine partielle saure Hydrolyse ist unter diesen Bedingungen nicht auszuschließen.

Bei der systematischen Untersuchung der oben aufgeführten Präparate konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß die Spaltung des Apoproteins bei der Gefrier Trocknung erfolgt. Auch bei Gefrier Trocknung des nativen Holoenzym wird ein erheblicher Teil gespalten. Dieses Ergebnis erklärt die Beobachtungen von BECKER⁶⁾, der einen sehr großen Aktivitätsverlust in lyophilisiertem Enzym feststellte. Auch das im früheren Darstellungsverfahren übliche Trocknen des Emulsins hatte einen hohen Aktivitätsverlust zur Folge¹⁰⁾, der sicher gleichermaßen auf eine Spaltung des Enzyms zurückzuführen ist.

Das unterschiedliche Ausmaß der Spaltung von nativem Holoenzym und von Apoprotein bei der Gefrier Trocknung

zeigt deutlich die Bedeutung des FAD für die Stabilität nicht nur der Tertiär- sondern sogar der Primärstruktur der D-Oxynitrilase.

Die Spaltung kann aufgrund der eindeutigen Ergebnisse nicht dem Einfluß von Detergentien zugeschrieben werden. Sowohl das Holoenzym wie auch das native Apoprotein zeigen in 1 % Natriumdodecylsulfatlösung und 8 M Harnstofflösung auch bei Zusatz von Mercaptoäthanol keine Aufspaltung in Untereinheiten. Vielmehr haben die Untersuchungen von MENZEL³¹⁾ ergeben, daß das Enzym in 8 M Harnstofflösung nur sehr langsam in Apoprotein und FAD gespalten wird. Das Apoprotein aggregiert zu Polymeren, die nach 1 Woche in der Disc-Elektrophorese in Form von 3 Banden auftreten, nach 3 Wochen liegt ein hochmolekulares, nicht mehr trennbares Aggregat vor. Eigene Versuche mit längerer Einwirkung von 1 % SDS-Lösung ergaben, daß das Enzym ebenfalls in Apoprotein und Coenzym zerfällt, aber eine Aggregation zu Polymeren unterbleibt.



Abb. 4

Pherogramme von Mandel-D-Oxynitrilase Isoenzym II

Trennung einer Mischung von Holoenzym (untere Bande) und nativem Apoprotein (obere B.)

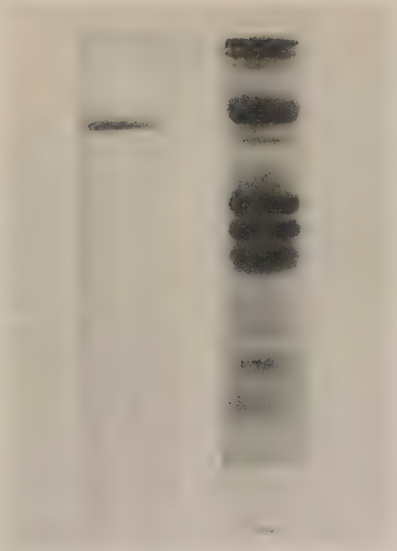


Abb. 5

Pherogramme von Mandel-D-Oxynitrilase Isoenzym II

links: natives Apoprotein

rechts: gefriergetrocknetes
Apoprotein

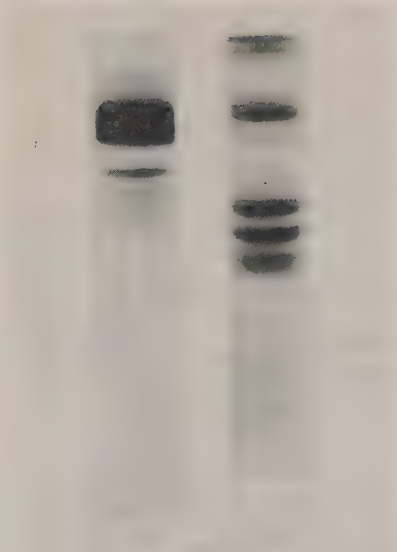


Abb. 6

Pherogramme von Mandel-D-Oxynitrilase Isoenzym II

links: gefriergetrocknetes
Holoenzym

rechts: gefriergetrocknetes
Apoprotein

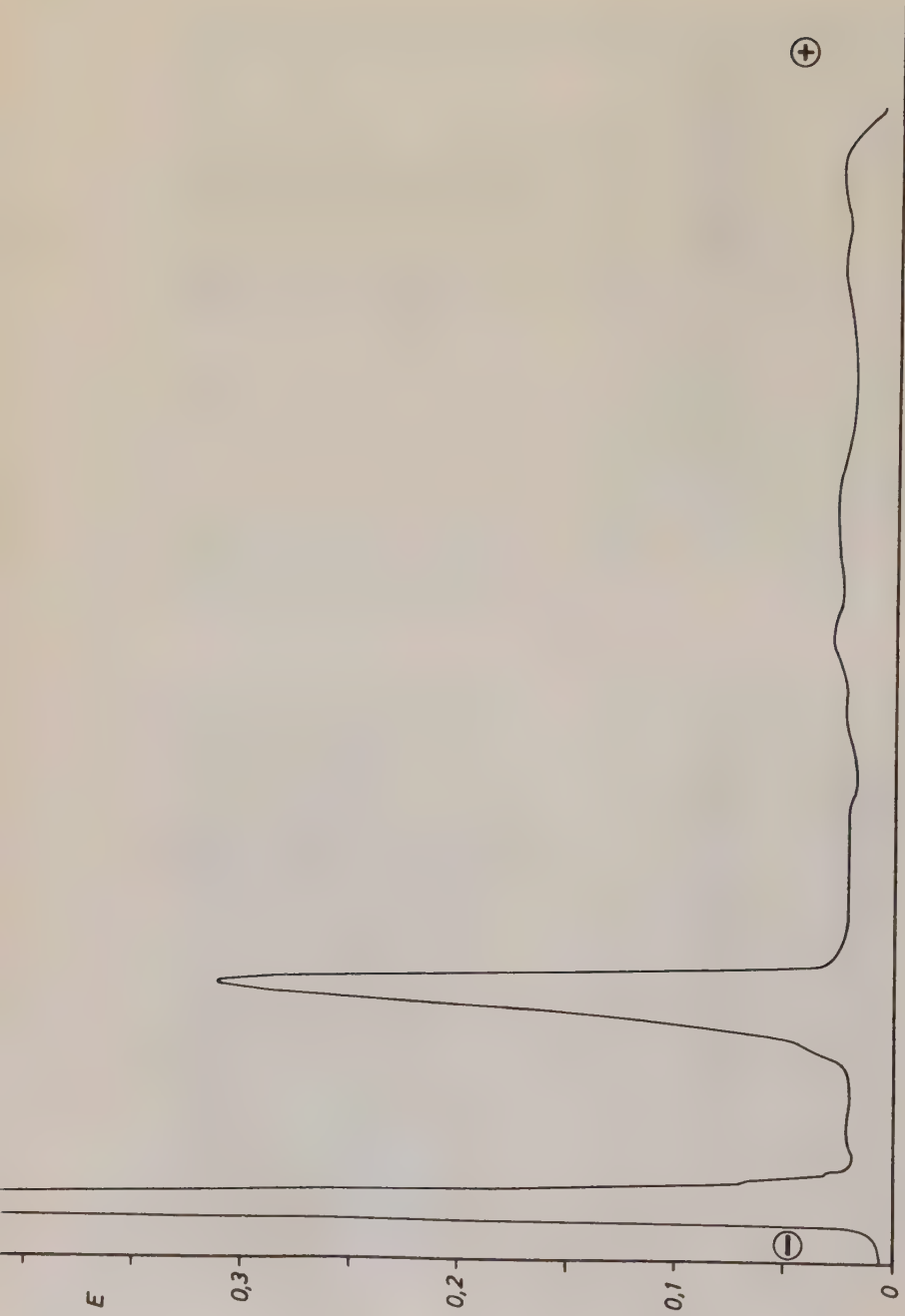


Abb. 7

Densitogramm von nativem Mandel-D-Oxynitrilase-Iso II-Apoprotein
(Pherogramm s. Abb. 5)

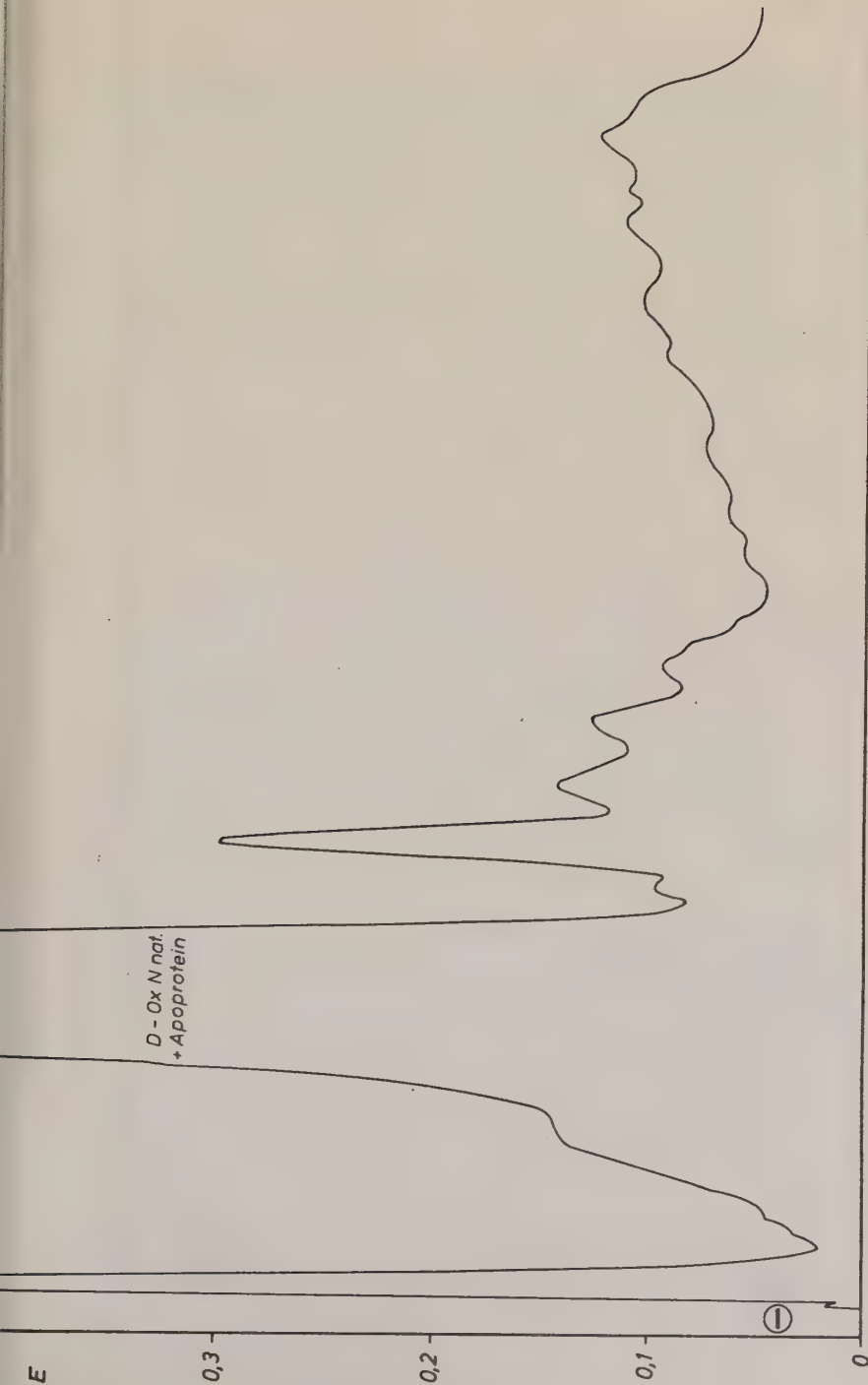


Abb. 8

Densitogramm von gefriergetrocknetem Holoenzym, Mandel-D-Oxynitrilase Isoenzym II
(Pherogramm s. Abb. 6)

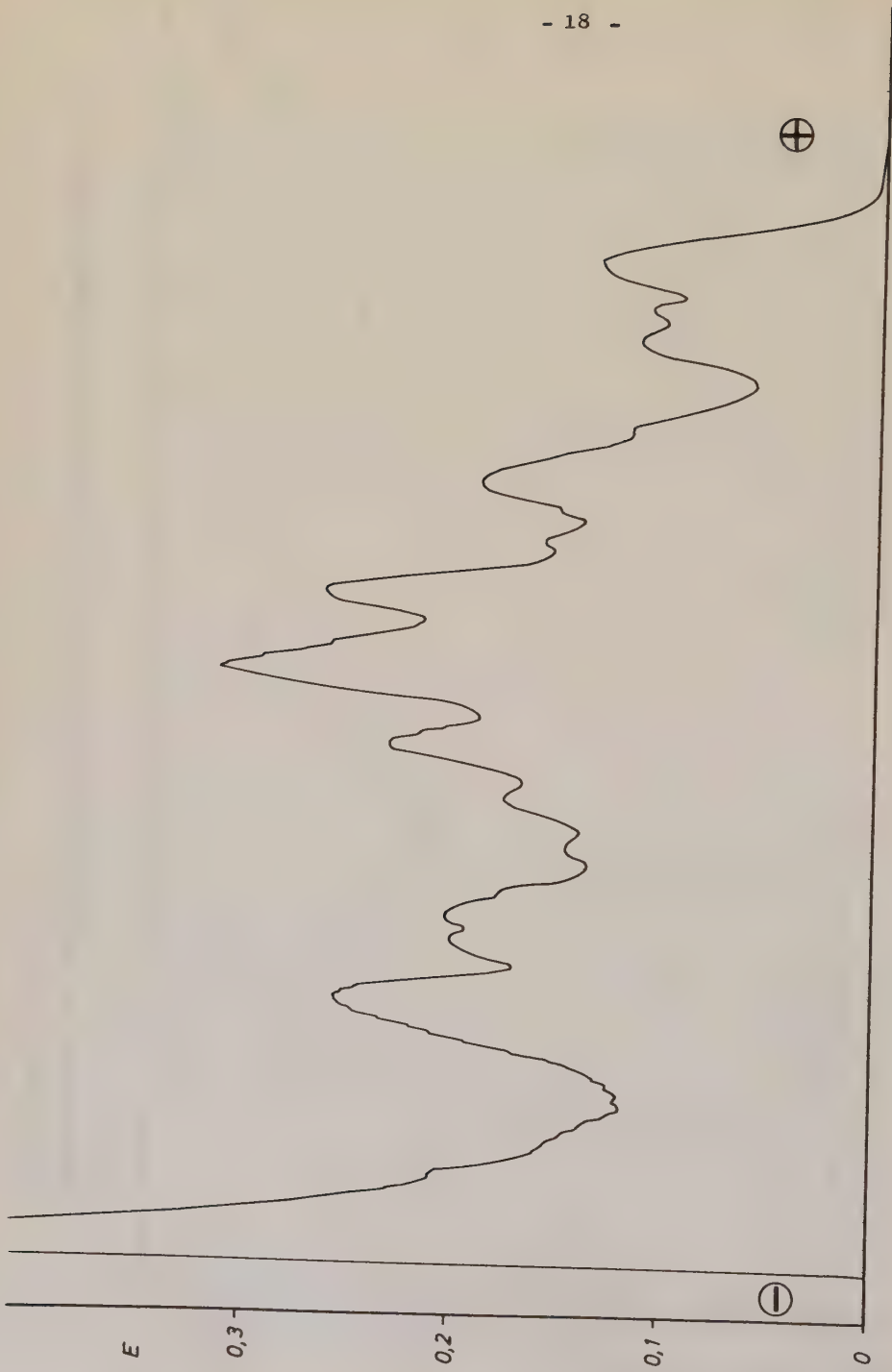


Abb. 9

Densitogramm von gefriergetrocknetem Apoprotein, Mandel-D-Oxynitrilase Isoenzym II

Die Elektropherogramme von nativem und gefriergetrocknetem Holoenzym sowie nativem und gefriergetrocknetem Apoprotein zeigen deutlich die Spaltung des Proteins durch Gefriertrocknung. Das Holoenzym ist wesentlich stabiler als das Apoprotein.

Die außergewöhnliche Empfindlichkeit des Mandel-D-Oxynitrilase-Apoproteins in der Gefriertrocknung macht eine Überprüfung der Arbeitsbedingungen erforderlich.

D.W. FLOSDORF³²⁾ hat schon 1949 in seiner Monographie über Gefriertrocknung die Schädigung von Enzymen beim Lyophilisieren aus stark verdünnten Säuren und aus Puffern bzw. Salzlösungen beschrieben.

L.v.d.BERG und D. ROSE³³⁾ konnten in ihren Untersuchungen über die Schädigung von Proteinen durch Salzeffekte zeigen, daß beim Gefrieren einer 0,02 M NaH_2PO_4 -Lösung von pH 4,5 zwischen $-0,1$ bis $-9,7^\circ\text{C}$ der pH-Wert auf 3,3 absinkt und die Salzkonzentration auf 3,42 M steigt. Aufgrund dieser Ergebnisse kann sowohl die erhöhte Salzkonzentration als auch die steigende $[\text{H}_3\text{O}^+]$ -Konzentration für die Denaturierung der Proteine verantwortlich sein.

Bei der FAD-Abspaltung nach STRITTMATTER mischt man unter Eiskühlung gleiche Volumina von D-Oxynitrilaselösung (10-15 mg Enzym/ml Pyrophosphatpuffer pH 7,5), 3 M Kaliumbromidlösung und saure gesättigte Ammonsulfatlösung (pH 1,6). Die Mischung hat pH 2,2 - unter diesen Bedingungen tritt, bewiesen durch die Elektropherogramme und die Möglichkeit zur Resynthese von aktivem Holoenzym, keine Spaltung von Peptidbindungen auf. Um eine erschöpfende Spaltung sicherzustellen, ist die Prozedur nach Abzentrifugieren des ausgefällten Apoproteins zweimal zu wiederholen.

Zur Entfernung der Säure schließt sich eine Umfällung mit gesättigter Ammonsulfatlösung an. Der Spaltung und Umfällung folgt eine dreitägige Dialyse bei 0°C gegen destilliertes Wasser unter mehrfachem Wasserwechsel.

Das Verfahren stellt sicher, daß die Abspaltung des FAD ohne stärkeres Ansäuern erfolgt. Die voluminösen Bromidionen verdrängen das FAD vom Apoprotein, da keine kovalente Bindung vorliegt. Durch ständige Kühlung unterbleibt die sonst eintretende Aggregation des Apoproteins. Das zur Spaltung und Umfällung eingesetzte Ammoniumsulfat ist durch die Dialyse sicher entfernt. Damit sind die Forderungen von J. EVERSE und F. E. STOLZENBACH³⁴⁾ erfüllt, die zur Verhinderung von Komplikationen bei Gefriertrocknung Vermeidung von Säuren und völlige Entsalzung empfehlen.

Die bei Gefriertrocknung eintretende Hydrolyse von Peptidbindungen des Apoproteins muß damit auf eine bei der Dialyse nicht entfernte Protonierung aus der Spaltung nach STRITTMATTER und besonders empfindliche Bindungen zurückgeführt werden. Durch den Wasserverlust bei Gefriertrocknung steigt die Protonenkonzentration proportional zum Wasserverlust, sodaß wir von einer Protonierung der Carboxylatgruppen und Amidgruppen im Protein ausgehen können. Die Protonierung führt zu einer Hydrolyse bestimmter Peptidbindungen und damit zur partiellen Spaltung des Proteins.

Die Stabilität von Peptidbindungen bei erhöhter Protonenkonzentration ist sehr unterschiedlich. Bei der sauren Hydrolyse von Proteinen tritt Asparaginsäure sehr früh frei auf, woraus folgt, daß die Peptidbindungen dieser Aminosäure besonders empfindlich sind und leicht gespalten werden können.³⁵⁾

S.J.LEACH³⁶⁾ untersuchte Mechanismus, Kinetik und Empfindlichkeit der sauren Hydrolyse unter verschiedenen Bedingungen. Seine Ergebnisse führten zur Entwicklung von Methoden zur partiellen sauren Hydrolyse von Proteinen durch verdünnte Säuren, die sich aber nicht auf Dauer durchsetzen konnten. S.BLACKBURN und G.R.LEE³⁷⁾ hatten festgestellt, daß die bevorzugte Hydrolyse bestimmter Bindungen eine Funktion des pH-Wertes und nicht der Art der Säure ist.

Die am meisten angewandte Methode wurde von J.SCHULTZ et. al.³⁸⁾ entwickelt; zur Hydrolyse verwenden sie 0,03 N HCl bzw. 4,5 % Essigsäure mit pH 1,8 - 1,9. Die Spezifität der Spaltung von Proteinen nahe pH 2 ist unter den beschriebenen Bedingungen (Hydrolysetemperatur 105°C, -dauer 40 Stunden) sehr groß; sie führt fast ausschließlich zur Hydrolyse der Peptidbindungen von Asparaginsäure und Asparagin unter Freisetzung von Asparaginsäure und Ammoniak aus Amidgruppen.

Die Autoren³⁸⁾ berichten auch, daß in Insulin und Ribonuclease ein Asparaginsäureäquivalent, jeweils aus der Sequenz Asp-Cys nach ihrer Methode nicht gespalten wird. Für die Hydrolyse von Ribonuklease mit 0,03 N HCl bei 105°C geben sie die Dauer bis zum Auftreten von 1 Äquivalent freier Aminosäuren wie folgt an:

Asparaginsäure	41	Stunde(n)
Lysin	30	"
Alanin	40	"
Threonin	44	"
Serin	48	"
Glutaminsäure	55	"
Glycin	56	"

Diese Angaben sind natürlich nicht auf die Hydrolyse durch Gefriertrocknung übertragbar, demonstrieren aber eindeutig die besondere Empfindlichkeit der Asparaginsäure-Peptidbindungen gegen saure Hydrolyse.

Die relative Zunahme der $[H_3O^+]$ -Konzentration durch Gefriertrocknung muß auch bei D-Oxynitrilase-Apoprotein zur Spaltung besonders empfindlicher Asparaginsäure-Peptidbindungen führen. Die Aminosäureanalysen zeigen aber, daß im Gegensatz zur sauren Hydrolyse bei erhöhter Temperatur keine freie Asparaginsäure entsteht, was bedeutet, daß nur eine Peptidbindung der Aminosäure gespalten wird. Die geringe Zahl der Peptide läßt den Schluß zu, daß die Hydrolyse nur einen Teil der Asparaginsäurereste erfaßt, oder daß sie überwiegend als Asparagin vorliegen.

Nach J.SCHULTZ muß das Asparaginsäureamid zuerst durch Hydrolyse in Asparaginsäure überführt werden, ehe es zu einer Spaltung von Peptidbindungen kommen kann. Unter den Bedingungen der Gefriertrocknung wird diese stufenweise Hydrolyse sicherlich nicht ablaufen, sondern nur die Spaltung der Peptidbindungen von Asparaginsäure selbst.

G.F.GRANNIS³⁹⁾ formuliert den Verlauf der sauren Hydrolyse in verdünnter HCl, wie auf der folgenden Seite dargestellt, in mehreren Reaktionsschritten. Von diesen Reaktionen müssen bei Gefriertrocknung aus dem Protein II die unter III und IV wiedergegebenen Peptide hervorgehen. Die Formulierung von GRANNIS erklärt aber nicht den eigentlichen Reaktionsverlauf, sodaß noch Überlegungen zum Reaktionsmechanismus folgen müssen.

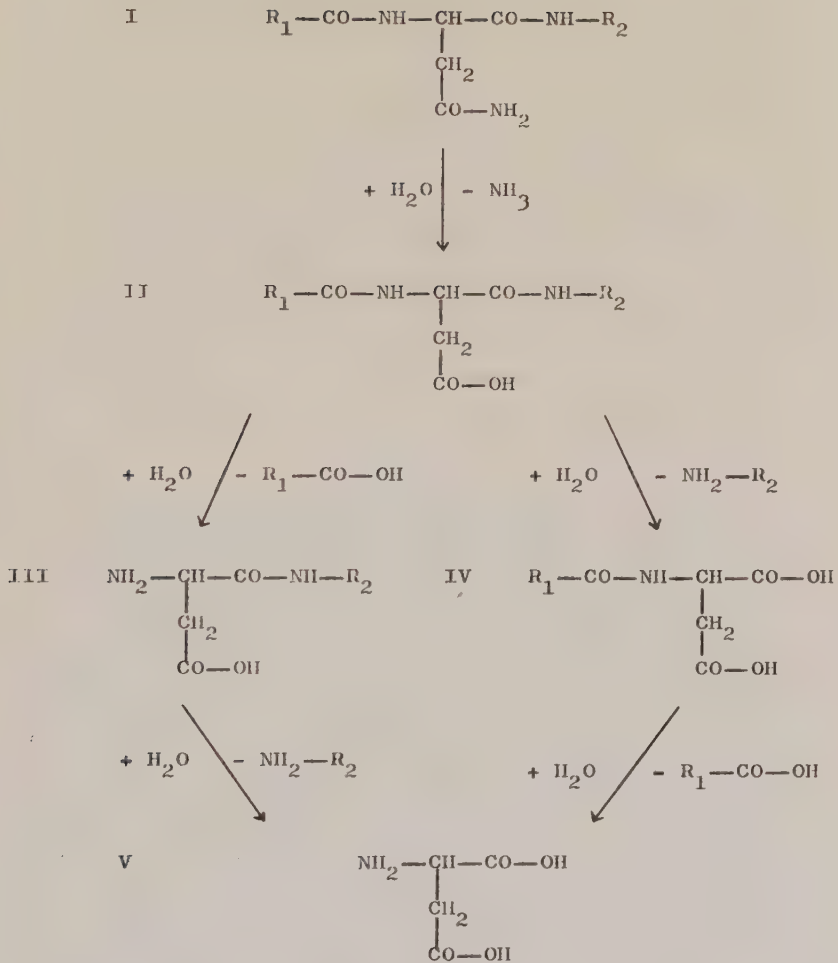


Abb. 10

Spaltung der Peptidbindungen und Freisetzung von Asparagin (-säure) bei Hydrolyse in verdünnter HCl nach G. F. GRANNIS

B. WITKOP⁴⁰⁾ formulierte für die Bildung freier Asparaginsäure durch Hydrolyse von Proteinen in stark verdünnter Säure einen komplizierten Reaktionsmechanismus. Grundlage ist der Nachbargruppeneffekt der β -Carboxylgruppe von Asparaginsäure; katalysiert durch Protonierung der Amidgruppen kann diese Carboxylgruppe intramolekular nucleophil an den benachbarten, stark positivierten Säureamid-Kohlenstoffatomen angreifen. Als Zwischenprodukt postuliert der Autor eine Säureanhydridbildung zwischen drei benachbarten Carboxylgruppen. Die Spaltung der beiden Asparaginsäure-Peptidbindungen und Hydrolyse des Anhydrids setzt schließlich zwei Peptide und Asparaginsäure frei. Nach WITKOP liegen für das Auftreten von Säureanhydrid als Zwischenprodukt ausreichende Beweise vor.

Bei der Spaltung nur einer Peptidbindung von Asparaginsäure durch saure Hydrolyse bei Gefriertrocknung kann man ebenfalls von einer verstärkten Positivierung des Säureamid-Kohlenstoffs nach Protonierung der Amidgruppen ausgehen. Der von mir vorgeschlagene Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 11 auf der folgenden Seite dargestellt. Ausgehend von Formel II führt der nucleophile Angriff der β -Carboxylgruppe von Asparaginsäure am eigenen elektrophilen C-Atom zur Substitution des Peptids bei gleichzeitiger Bildung von Asparaginsäureanhydrid, letzteres bleibt durch die Peptidbindung seiner α -Aminogruppe mit dem Restprotein verbunden (Formel IV). Bei späterer Lösung des gefriergetrockneten Präparats in Pufferlösung oder verdünnter Säure wird Asparaginsäureanhydrid hydrolysiert und damit das Endprodukt der Hydrolyse (Formel V) erreicht. Nach diesem Reaktionsmechanismus sollten die bei der partiellen sauren Hydrolyse durch Gefriertrocknung erhaltenen Peptide am Carboxylende bevorzugt Asparaginsäure tragen.

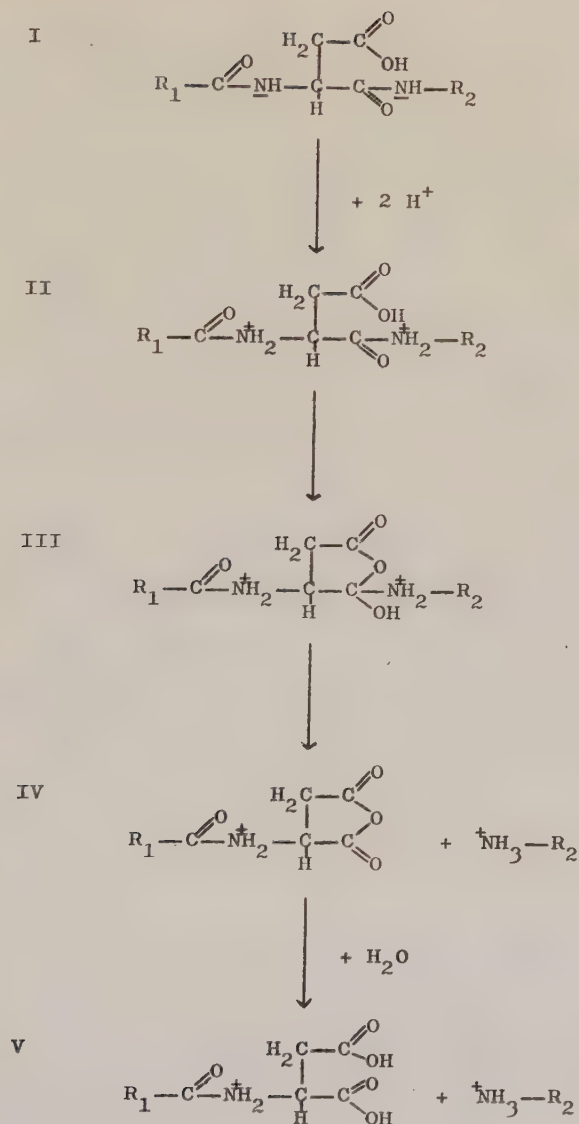


Abb. 11

Spaltung der Carboxyl-Peptidbindung von Asparagin
(-säure) durch nucleophile Substitution

Aus sterischen Gründen ist es aber auch möglich, daß der nucleophile Angriff der β -Carboxylgruppe nicht am eigenen C-Atom der Asparaginsäure, sondern an dem der benachbarten Aminosäure erfolgt. Hierbei entsteht als Zwischenprodukt kurzfristig ein spannungsfreier heterozyklischer 6-Ring (Formel III in Abbildung 12). Die weitere Reaktion führt zur Spaltung der Amino-Peptidbindung von Asparaginsäure und zur Bildung von Anhydrid zwischen der β -Carboxylgruppe von Asparaginsäure und der α -Carboxylgruppe der benachbarten Aminosäure. Die endgültige Trennung der Peptide (Endprodukte Formel V) tritt erst durch Hydrolyse des Anhydrids beim Lösen des lyophilisierten Materials ein.

Endgruppenanalysen können klären, welcher Mechanismus bei der hydrolytischen Spaltung durch Gefrier-trocknung bevorzugt abläuft, da Asparaginsäure überwiegend am Carboxylende der Peptide stehen muß, wenn der nucleophile Angriff der Seitengruppe am 1. C-Atom der Asparaginsäure erfolgt. Im Gegensatz dazu sollte Asparaginsäure bei dem alternativen Reaktionsverlauf am Aminoende der Peptide zu finden sein.

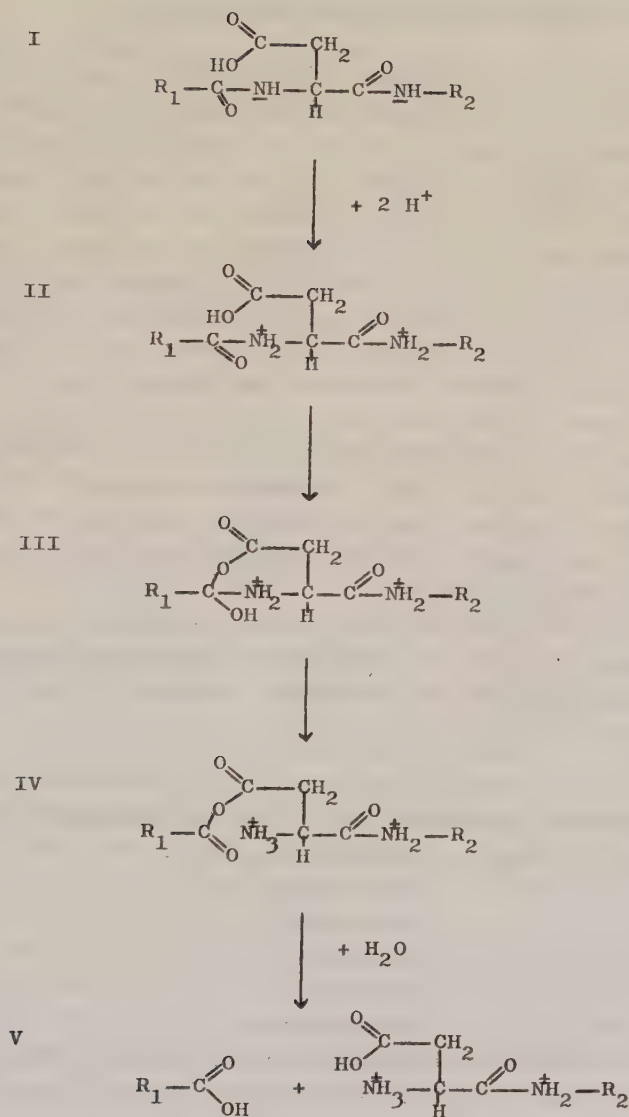


Abb. 12

Spaltung der Amino-Peptidbindung von Asparagin
(-säure) durch nucleophile Substitution

4. Charakterisierung von Isoenzymen und Peptiden

4.1 Molekulargewichtsbestimmung der Peptide

Die Bestimmung der Molekülmassen erfolgt nach OSBORN und WEBER³⁰⁾ mithilfe der kontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Peptide und Eichproteine werden in Natriumdodecylsulfat- und β -Mercapto-äthanol-haltiger Lösung inkubiert und in 10 cm langen Säulchen von 10 % Polyacrylamidgel durch Anlegen eines elektrischen Feldes getrennt. Die Methode basiert darauf, daß sich die Proteinmoleküle während der Inkubation durch Detergentieneinfluß und reduktive Spaltung der Disulfidbrücken entfalten und proportional zur Molekülmasse durch adsorbiertes Dodecylsulfat negativ aufladen. Diese gleichsinnige Aufladung wäre ohne SDS-Zusatz zu dem 0,01 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,0 nicht möglich. Die Mobilität der Proteine und Peptide ist bei Erfüllung dieser Annahme dem Logarithmus der Molekülmasse proportional.

(C.A.NELSON⁴¹⁾ konnte durch genaue Untersuchung der Adsorption von SDS an verschiedenen Enzymen allerdings unterschiedliche Bindungsraten zwischen 1,1 und 2,2 % feststellen).

Die Molmassenbestimmung wird mit S-carboxymethyliertem Apoprotein von Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzym II durchgeführt. Folgende Eichproteine werden eingesetzt:

Insulin Kette B
Cytochrom c
Trypsin
Ovalbumin
Serumalbumin

Die käuflichen Eichproteine sind für diese Methode z.T. nicht rein genug, sodaß Verunreinigungen störende zusätzliche Proteinbanden liefern. Bei der Vermessung werden dann die klar erkennbaren Hauptbanden ausgewählt.

Die in der Elektrophorese zurückgelegten Laufstrecken werden an den fixierten und gefärbten Gelsäulchen vermessen.

Aus dem Quotienten von Laufstrecke einer Bande und Gesamttrennstrecke der Elektrophorese (Marker), unter Berücksichtigung von Schrumpfung oder Quellung der Gelsäulen beim Fixieren, Färben und Entfärben, werden die Faktoren für die Mobilität der Eichproteine ermittelt. Diese Faktoren trägt man graphisch gegen den dekadischen Logarithmus der Molmassen^{30,42)} auf. Die Werte liegen auf einer Geraden, die als Eichkurve zur graphischen Ermittlung der Molmassen der untersuchten Peptide dient.

Tabelle 1

Molmassen und Mobilität der Eichproteine

Protein	Molmasse	log MM	Mobilität (relativ)
Insulin Kette B	6 745 ^{x)}	3,829	0,963
Cytochrom c	11 700	4,068	0,772
Trypsin	23 300	4,367	0,592
Ovalbumin	43 000	4,634	0,386
Serumalbumin	68 000	4,833	0,224

x) Anteilmäßig aus der Molmasse von Insulin errechnet

Bei Insulin Kette B ergibt sich eine gewisse, für die MM-Bestimmung der niedermolekularen Peptide relevante Abweichung. Ermittelt man die Molmassen der Peptide 1 und 2 aus einer Geraden durch die Punkte von Cytochrom c und Insulin Kette B, so ergeben sich um etwa 10 % höhere Werte. Die so errechneten Massen sind in der folgenden Tabelle in Klammern zusätzlich angegeben.

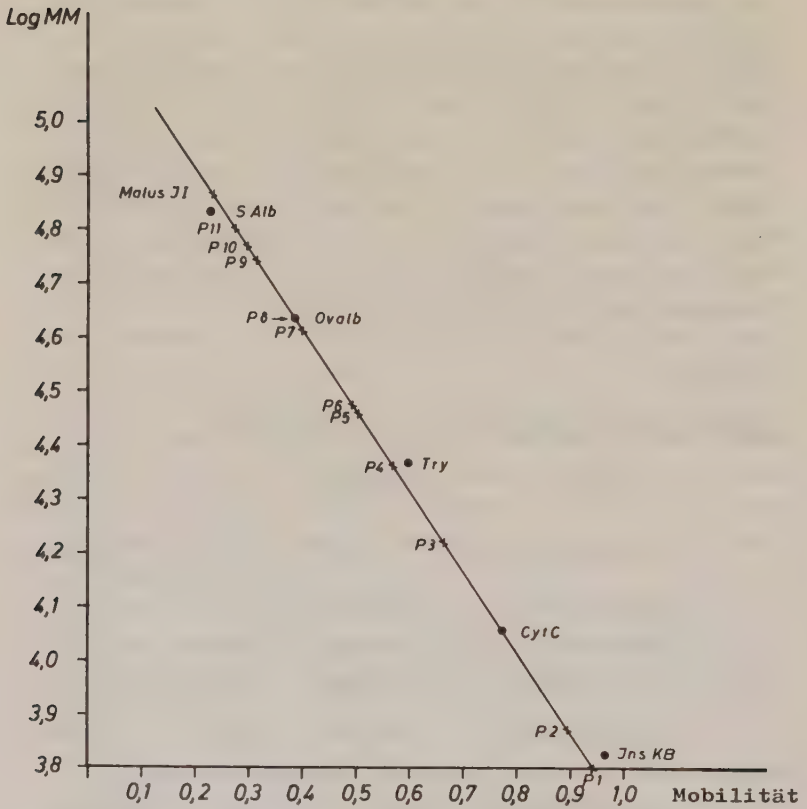


Abb. 10

Molekülmassenbestimmung durch
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

P 1 - P 11 S-carboxymethylierte Peptide von Mandel-
D-Oxynitrilase Iso II Apoprotein

Malus J I S-carboxymethyliertes Apoprotein von
Apfel-D-Oxynitrilase Iso I

Tabelle 2

Molmassenbestimmung der Peptide (Gefriertrocknung)
von S-carboxymethyliertem Mandel-D-Oxynitrilase-Iso-
Enzym-Apoprotein

Peptid	Mobilität (relativ)	log MM	Molmasse
1	0,946	3,800	6 300 (7 000)
2	0,893	3,875	7 500 (8 200)
3	0,661	4,220	16 600
4	0,571	4,358	24 250
5	0,509	4,458	28 700
6	0,491	4,479	30 130
7	0,411	4,612	40 900
8	0,384	4,635	43 150
9	0,313	4,740	55 000
10	0,295	4,770	58 900
11	0,275	4,800	63 100

Die Molmassenbestimmung zeigt deutlich, daß es sich bei der Bande von Peptid 11 um mehr oder weniger unverändertes Apoprotein handelt. Diese Identifizierung ist auch schon durch direkten Vergleich paralleler Trennungen von Peptiden und nativem Apoprotein möglich.

Die Molmassen der anderen Peptide sind auffällig gestaffelt; das Molekül zerfällt nicht in Untereinheiten, sondern bricht bei der Gefriertrocknung an wenigen, vielleicht nur ein oder zwei Peptidbindungen auf, woraus wenige, große Peptide resultieren. Diese Auffassung wird dadurch gestützt, daß sich die Molmassen mehrerer Peptide gut zur Molmasse des Apoproteins ergänzen.

Die quantitative Bestimmung der Anteile der einzelnen Peptide am Peptidgemisch stützt diese Theorie.

4.2 Quantitative Bestimmung der Peptidfraktionen in S-carboxymethyliertem Mandel-D-Oxn-Iso II -Apoprotein

Die fixierten und gefärbten Pherogramme der Polyacrylamidgel-Elektrophorese ermöglichen eine quantitative Bestimmung der Protein- und Peptidfraktionen durch Vermessung der optischen Dichte über die gesamte Länge der Gelsäule. Ein Densitometerzusatz (Hersteller: ERDMANN u. GRÜN, Wetzlar) zum ZEISS PMQ II Spektralphotometer mit lin/log-Wandler und Schreiber wird zur Aufnahme der wiedergegebenen Extinktionskurven eingesetzt. Mithilfe der H x W -Methode werden die Peakflächen und daraus der prozentuale Anteil der einzelnen Peptide bestimmt.

Tabelle 3

Werte zur Ermittlung der prozentualen Anteile der Peptide

Peptid	1/2Peakhöhe(H) (Papiereinh.)	Breite(W) (mm)	H x W	Anteil (%)
1	2,34	16,5	38,6	27,5
2	0,55	19,0	10,4	7,4
3	0,24	13,0	3,1	2,2
4	0,24	14,0	3,4	2,4
5	0,35	8,0	2,8	2,0
6	0,90	13,5	12,2	8,7
7	0,25	7,0	1,8	1,3
8	2,80	10,0	28,0	19,9
9	1,83	9,0	16,5	11,7
10	1,70	8,5	14,5	10,3
11	1,10	8,5	9,4	6,7

100,1

Die Werte von Tabelle 3 wurden aus der folgenden Abbildung der Extinktionsmessung ermittelt.

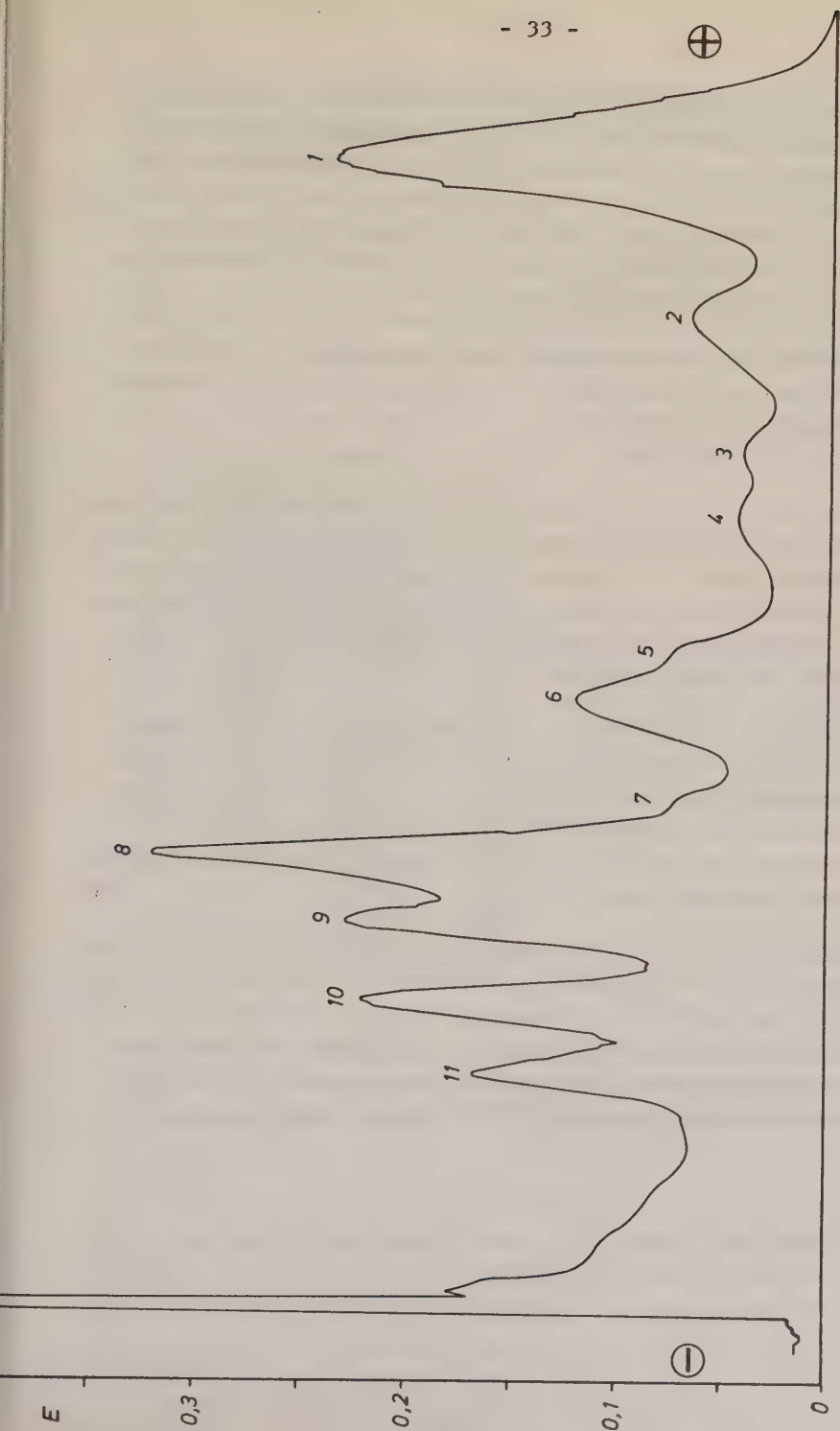


Abb. 11

Densitogramm der s-carboxymethylierten Peptide von Mandel-D-Oxynitrilase Iso II Apoprotein
(Pherogramm s. Abb. 12)

Die quantitative Auswertung läßt erkennen, daß etwa 7 % des Apoproteins bei der Gefriertrocknung und anschließenden Reduktion und Alkylierung, die ebenfalls mit der Gefriertrocknung des Präparats abschließt, nicht gespalten werden. Dieser Teil variiert etwas bei verschiedenen Präparationen und erklärt die teilweise unterschiedliche Stärke einzelner Banden.

Auffällig sind die hohen Anteile der hoch- und niedermolekularen Fraktionen bei Anteilen von 1,3 - 2,4 % der Peptide mit MM von 16 000 bis 41 000; nur Peptid 6 mit der MM 30 000 fällt hier mit 8,7 % deutlich heraus.

Peptid Nr. 1, das aufgrund der diffusen Bande sicher keine einheitliche Fraktion darstellt, erklärt durch seinen hohen Anteil die Existenz von viel hochmolekularen Peptiden. Es ist anzunehmen, daß hier im Apoprotein nur eine Peptidbindung aufbricht unter Bildung eines sehr schweren und eines leichten Bruchstücks.

Brüche in der Mitte der Proteinmoleküle sollten Bruchstücke mit einer MM von etwa 30 000 AME liefern - gerade diese Fraktion hat mit 8,7 % einen recht erheblichen Anteil, was dadurch erklärt werden kann, daß hier beide Bruchstücke die gleiche Masse (etwa) haben und zusammen eine stärkere Bande liefern.

Der höhere Anteil von Peptid 7/8 mit MM 40 000 - 43 000 gegenüber den Peptiden 3, 4 und 5 mit MM 16 500 - 28 000 ist verständlich wenn angenommen wird, daß hierbei im Apoprotein zwei Brüche aufgetreten sind, die zwei leichte Peptide unter MM 10 000 und ein schwereres Polypeptid mit einer MM von etwa 40 000 AME entstehen lassen.

4.3 Vergleich der Peptidmuster (Pherogramme) von gefriergetrocknetem mit S-carboxymethyliertem Apoprotein von Mandel-D-Oxynitrilase Isoenzym II

Gefriergetrocknetes und S-carboxymethyliertes Apoprotein werden in einem Lauf in der kontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt. Die unten abgebildeten Pherogramme der fixierten und gefärbten Gelsäulen unterscheiden sich geringfügig in der Trennstrecke.

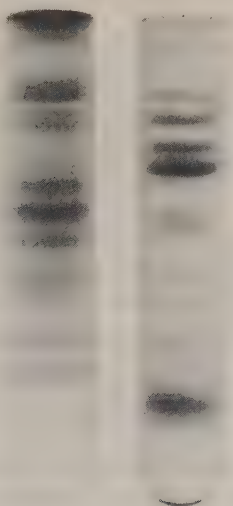


Abb. 12

Pherogramme von Mandel-D-Oxynitrilase Isoenzym II

links gefriergetrocknetes Apoprotein; rechts S-carboxymethyliertes Apoprotein

Die beiden Pherogramme zeigen erhebliche Unterschiede in Zahl und Verteilung der Peptidbanden. Zur besseren Vergleichbarkeit sind auf den folgenden Seiten Densitogramme der beiden Gelsäulen abgebildet.

Im hochmolekularen Bereich am Anfang des Gels zeichnet sich das gefriergetrocknete Material durch einen hohen Anteil an hochmolekularen Aggregaten aus, die beim Eintritt in das Gel hängenbleiben bzw. in schmalen Banden

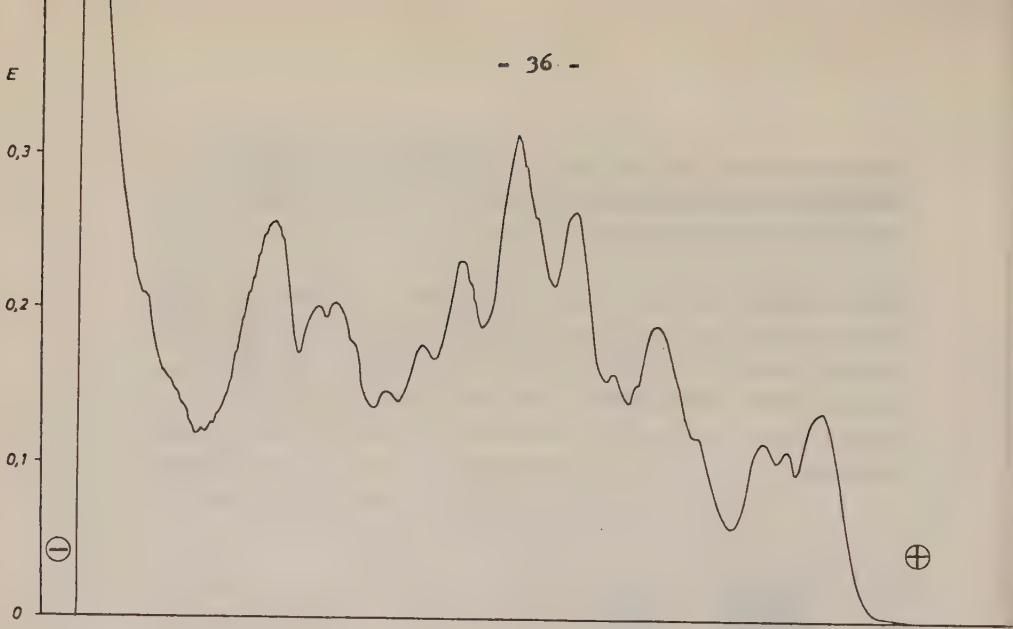


Abb. 9

Densitogramm von gefriergetrocknetem Apoprotein,
Mandel-D-Oxynitrilase Isoenzym II

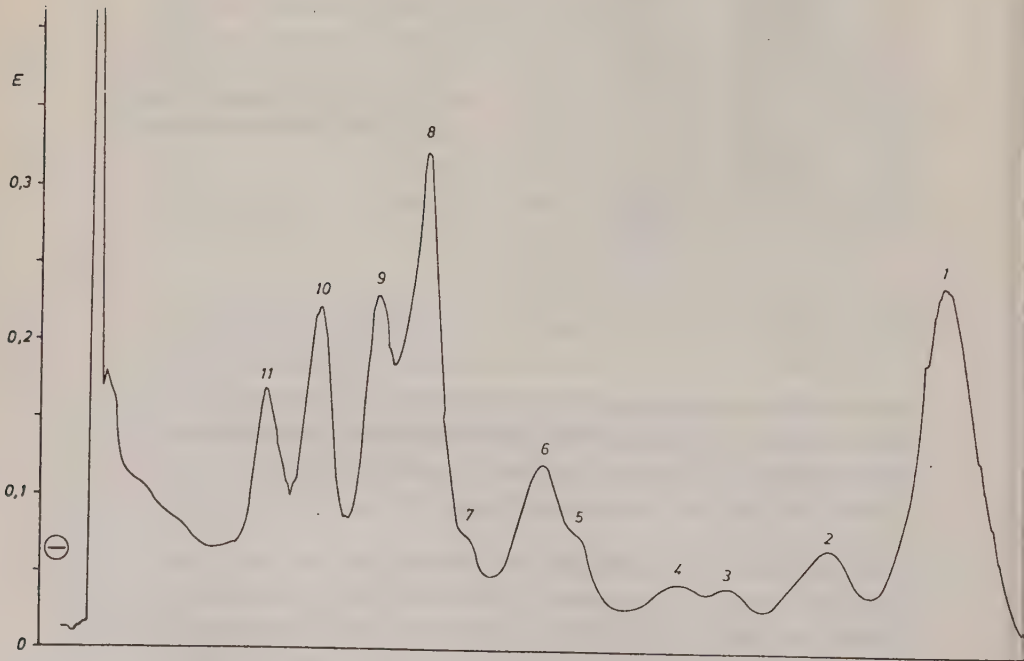


Abb. 11

Densitogramm der S-carboxymethylierten Peptide,
Mandel-D-Oxynitrilase Isoenzym II Apoprotein

geringfügig wandern. Diese Aggregate treten in allen nicht carboxymethylierten Präparaten auf, was die Bedeutung freier SH-Gruppen für die Vernetzung der Aggregate dokumentiert.

Die Zahl der Banden ist in gefriergetrocknetem Apoprotein wesentlich höher als im S-carboxymethylierten Präparat. Hier können - ohne Berücksichtigung der hochmolekularen Aggregate - 16 Peptidbanden gezählt werden, die im Pherogramm deutlich getrennt nebeneinander liegen, im Densitogramm wegen des geringen Abstandes z.T. nur als Schultern höherer Peaks in Erscheinung treten.

Auffällig ist der geringe Anteil der niedermolekularen Fraktion und der deutlich höhere Anteil der Fraktionen mit Molekülmassen von etwa 16 000 - 40 000 AME in gefriergetrocknetem Apoprotein. Die Peptide mit Molmassen über 40 000 bis unter 60 000 AME treten wiederum in geringerer Menge auf.

Eine genaue quantitative Bestimmung wird durch die geringen Abstände zwischen den Peptidbanden erschwert. Die erhöhte Basislinie im Densitogramm des gefriergetrockneten Materials dokumentiert gleichzeitig eine stärkere Aggregationsneigung der Peptide.

Die größere Zahl der Peptide im gefriergetrockneten Apoprotein kann durch Dimerisierung leichterer Peptide aufgrund nicht alkylierter SH-Gruppen oder durch teilweise noch nicht gespaltene Disulfidbrücken erklärt werden. Aus zwei Peptidfraktionen können so durch Verknüpfung eines Teils von beiden durch Disulfidbrücken drei Fraktionen entstehen, wobei die Molekülmasse der dritten Fraktion etwa der Summe der einzelnen Molmassen der beiden Peptide entspricht.

Diese Theorie wird durch die vom S-carboxymethylierten Präparat abweichenden mengenmäßigen Anteile der Peptidfraktionen gestützt.

4.4 Vergleich der Peptidmuster (Pherogramme) von Mandel-D-Oxynitrilase Isoenzym I und II

Die nach Gefriertrocknung reduzierten und alkylierten Apoproteine der Isoenzyme I und II wurden gleichzeitig in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt und die Pherogramme densitometrisch vermessen.

Die auf den folgenden Seiten abgebildeten Densitogramme sind im hoch- und niedermolekularen Bereich identisch, was aufgrund der Spezifität der Trennmethode eine Identität von Molekülmasse und Ladung und damit auch gleiche Primärstruktur bedeutet.

Im Bereich der Peptide 3 (MM 16 600) und 4 (MM 24 300) von Isoenzym II findet im Pherogramm von Isoenzym I eine Aufspaltung der Banden in die Peptidfraktionen 3 und 3' sowie 4 und 4' statt. Diese Peptide treten jeweils als Doppelbanden gleicher Intensität auf, und somit kann es sich hier ebenfalls um weitgehend identische Moleküle handeln, deren geringe Massendifferenzen durch unterschiedliche Tertiärstruktur bei fast identischer Primärstruktur vorgetäuscht werden.

Die im folgenden Abschnitt behandelten Ergebnisse der Aminosäurenanalyse zeigen, daß diese Peptide noch nicht alkyliertes Cystein enthalten, was die Existenz von Haftpunkten der Tertiärstruktur durch Disulfidbrücken auch in diesem Material noch wahrscheinlich macht.

Die Pherogramme zeigen nicht nur große Ähnlichkeit in der Lage der Peptidbanden. Auch die quantitativen Anteile der jeweiligen Fraktionen weisen große Übereinstimmung auf.

Zur weiteren Untersuchung dieser auffälligen Ähnlichkeit wurden Aminosäurenanalysen der drei Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzyme durchgeführt.

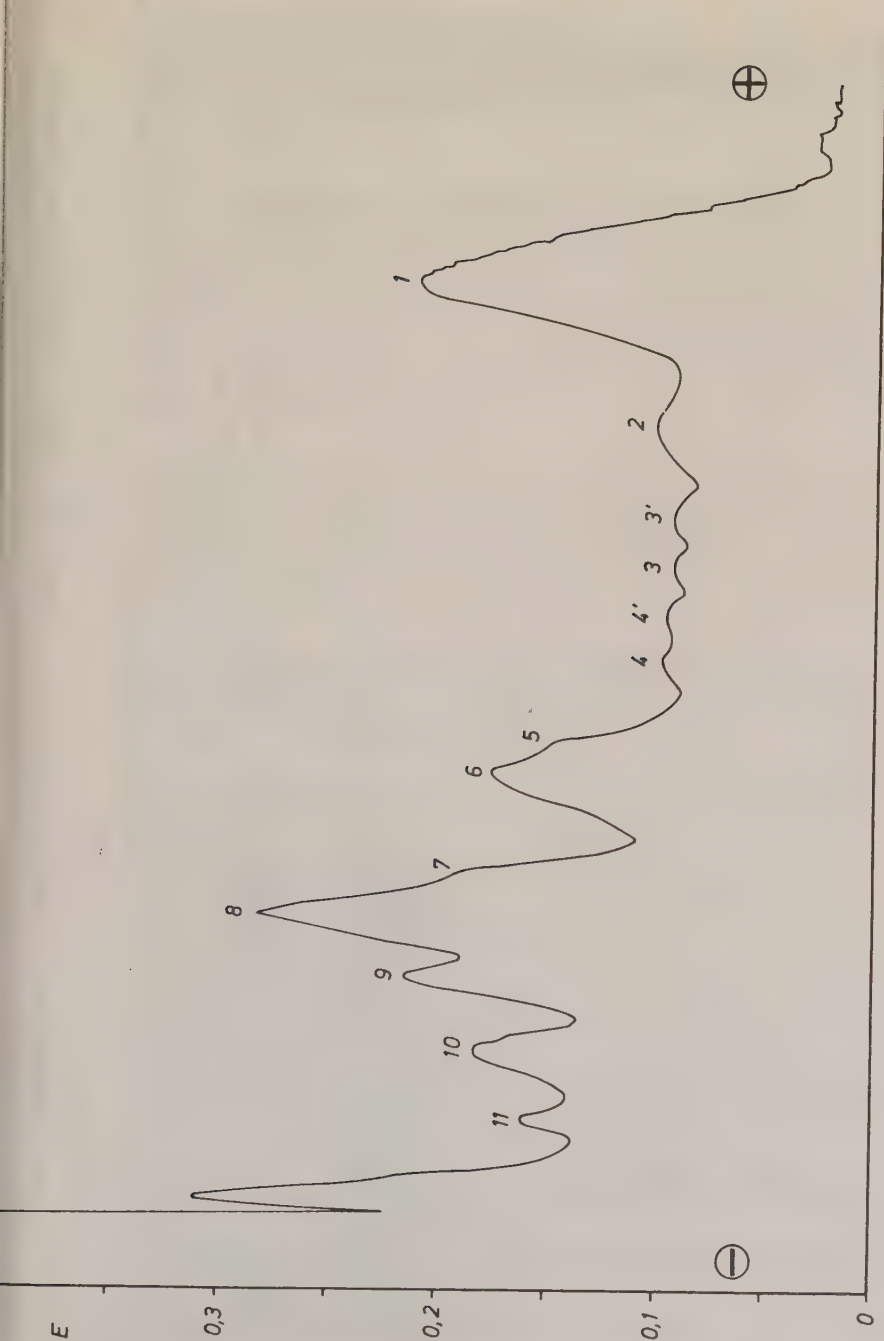


Abb. 14

Densitogramm der 3-carboxymethylierten Peptide, Mandel-D-Oxynitrilase Iso I Apoprotein

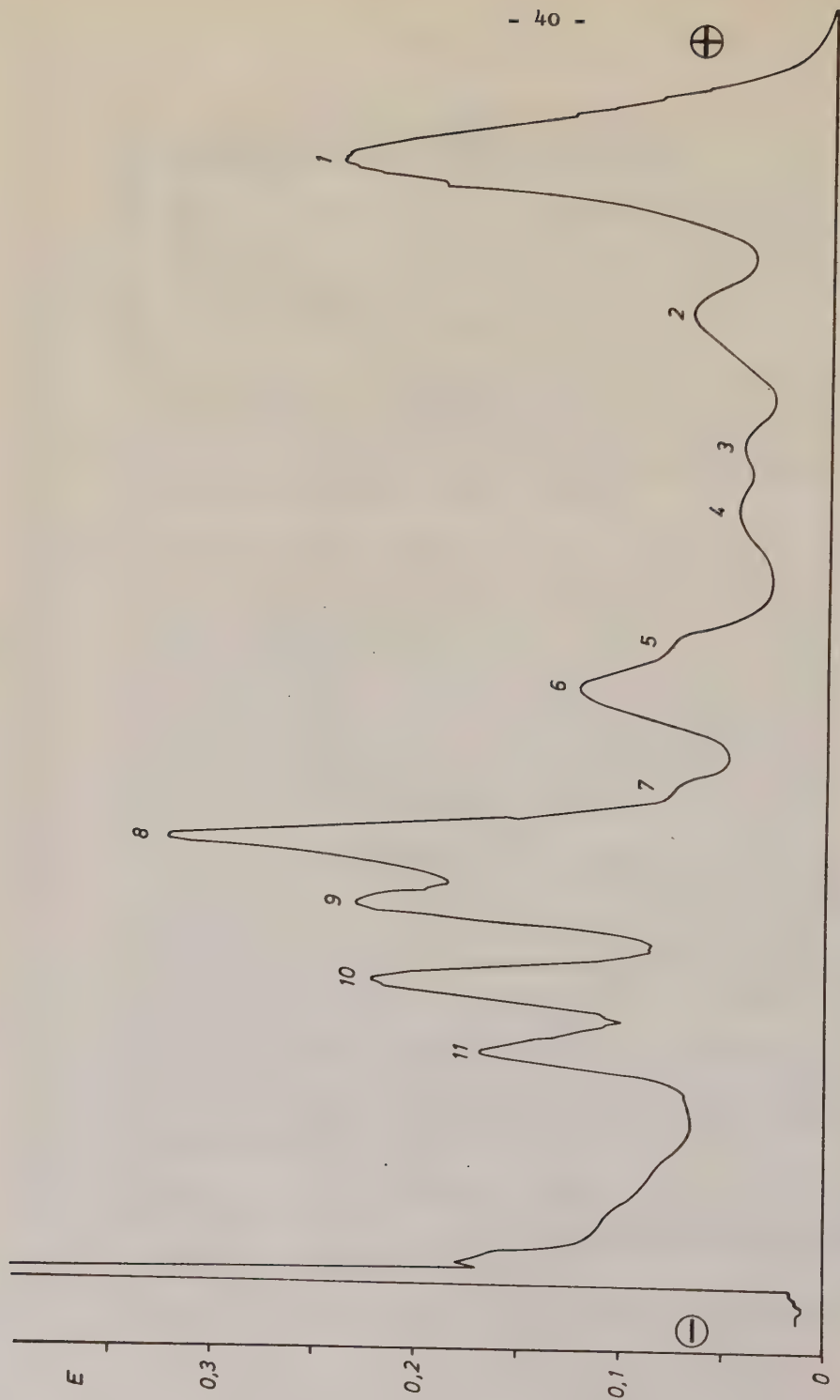


Abb. 11

Densitogramm der S-carboxymethylierten Peptide von Mandel-D-Oxynitrilase Isoenzym II Apoprotein

4.5 Vergleich der gefriergetrockneten und S-carboxymethylierten D-Oxynitrilase-Apoproteine von Mandel-Isoenzym II und Apfel-Isoenzym I

Das Pherogramm der nach STRITTMATTER gespaltenen, gefriergetrockneten und S-carboxymethylierten Apfel-D-Oxynitrilase zeigt eine durch hohe Konzentration sehr breite und intensive Bande von unverändertem Apoprotein. Nur bei hoher Apoproteinkonzentration werden im Pherogramm wenige sehr schwache Banden von Spaltprodukten sichtbar.

Der Vergleich der beiden Pherogramme von völlig gleich behandelten Enzymen zeigt eine wesentlich größere Stabilität der Apfel-D-Oxynitrilase gegenüber der Spaltung durch Gefriertrocknung und Reduktion mit β -Mercaptoäthanol.

Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird für Apfel-D-Oxynitrilase (CM-Apoprotein) Isoenzym I eine Molmasse von 73 000 AME ermittelt.

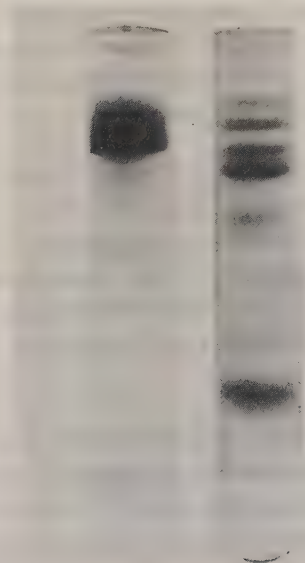


Abb. 15

Pherogramme von S-carboxymethylierten D-Oxynitrilase-Apoproteinen

links Apfel Isoenzym I
rechts Mandel Isoenzym II

4.6 Aminosäurenanalyse der Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzyme I, II und III

Die saure Hydrolyse der Apoproteine wird mit 5,7 N HCl bei 110° C 20 und 50 Stunden lang durchgeführt; die Werte von Serin und Threonin werden aufgrund der unterschiedlichen Hydrolyseausbeuten graphisch auf den Zeitpunkt 0 extrapoliert, um die Hydrolyseverluste zu korrigieren. Bei Valin und Isoleucin erhält man die Maximalwerte durch längere Hydrolyse.

Zur Vermeidung des Tyrosinabbaus durch evtl. auftretendes Chlor werden den Proben nach F.SANGER⁴³⁾ einige Phenolkristalle und zur Vermeidung möglicher Oxidation des Methionins 1 Tropfen Mercaptoäthanol zugesetzt. (Methode zur Erfassung aller Aminosäuren in einem sauren Hydrolysat siehe R.J.SIMPSON⁴⁴⁾.)

Die Präparation der Analysen erfolgt nach Vorschrift⁴⁵⁾ der Firma BECKMAN, München. Zur quantitativen Cysteinbestimmung wird dem Standard-Aminosäuren-Testgemisch von BECKMAN S-carboxymethyliertes Cystein zugesetzt. Das Cystein der Präparate liegt nach Reduktion und Alkylierung in dieser Form vor und bleibt so bei der Hydrolyse nahezu unverändert. S-Carboxymethylcystein löst sich vor Asparaginsäure vom Austauscher.

Die quantitativen Aminosäurenanalysen sind erforderlich, da frühere Analysenergebnisse¹²⁾ große Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung zeigen, die aufgrund der ähnlichen elektrophoretischen Eigenschaften der Holoenzyme und der geringen Unterschiede in den Pherogrammen der Spaltprodukte nicht vorliegen können.

Aufgrund der guten Zugänglichkeit der Isoenzyme und der höheren quantitativen Zuverlässigkeit werden die Analysen nach der Ein- und Zweisäulenmethode mit 9 mm starken Austauschersäulen am BECKMAN MULTICHROM durchgeführt.

Tabelle 4

Anteile der sauren, neutralen und basischen Aminosäuren
im sauren Hydrolysat von Apoproteinen der Mandel-D-Oxy-
nitrilase-Isoenzyme I, II und III

(Chromatographie: 2-Säulenmethode, Auswertung: H x W -Meth.)

Aminosäure	Iso I Mol %	Iso II Mol %	Iso III Mol %
CM-Cystein	0,8	0,7	-x)
Asparaginsäure	11,2	11,3	11,2
Threonin	7,0	7,2	7,0
Serin	10,2	10,3	10,0
Glutaminsäure	7,8	7,8	8,3
Prolin	6,3	6,2	6,1
Glycin	9,2	9,3	9,5
Alanin	5,9	5,9	6,2
Cystein	+	+	+
Valin	7,4	7,4	7,3
Methionin	0,9	0,8	0,9
Isoleucin	3,8	3,7	3,8
Leucin	9,3	9,4	9,5
Tyrosin	5,7	5,6	5,6
Phenylalanin	5,0	5,0	5,0
Tryptophan	+	+	+
Galaktosamin	(2,0)	(2,0)	(2,0)
Glucosamin	+	+	+
Lysin	3,8	3,7	3,9
Histidin	2,6	2,6	2,6
Arginin	3,1	3,2	3,1

x) nicht bestimmt; natives Apoprotein

+ sehr geringe Menge

Die in Tabelle 4 zusammengestellten Ergebnisse der Aminosäurenanalysen zeigen starke Abweichungen von früheren Angaben. Wichtigstes Ergebnis ist der Nachweis großer Übereinstimmung in der Zusammensetzung der Isoenzyme I, II und III.

Die Apoproteine aller drei Isoenzyme enthalten relativ viel Asparaginsäure (die hohe NH_3 -Konzentration der Analysen spricht für hohe Anteile an Asparagin und Glutamin), Serin, Glycin und Leucin aber wenig Histidin und sehr wenig Methionin.

Bei den meisten Aminosäuren sind die Unterschiede nicht signifikant sondern liegen im Bereich der Fehlergrenze. Die größten Abweichungen treten bei Glutaminsäure mit 0,5 und bei Glycin und Alanin mit 0,3 Mol % auf.

Die Werte für S-Carboxymethylcystein und der daraus resultierende Cysteingehalt müssen als nicht gesichert angesehen werden. Einzelne Analysen von carboxymethylierten Spaltprodukten des Apoproteins von Isoenzym II zeigen durch flache Cystein-Peaks eindeutig das Vorhandensein von nicht umgesetztem Cystein an, was bedeutet, daß bei der beschriebenen Methode nicht alle Cysteinreste alkyliert werden. Dadurch geht sicher ein erheblicher Teil dieser Aminosäure verloren, da unverändertes Cystein bei der Hydrolyse mit HCl zerstört wird.

Zur Identifizierung der unbekannten Komponente, die bei ASCHHOFF¹²⁾ und GERSTNER⁵⁷⁾ in den Aminosäurenanalysen von Mandel- bzw. Apfel-D-Oxynitrilase angegeben wurde, und die auch in diesen Analysen auftritt, wurde in einer später durchgeführten Vergleichsanalyse dem Testgemisch Galaktosamin zugesetzt. Das Hexosamin wird im Zweisäulenverfahren vor Lysin und im Einsäulenverfahren zwischen Leucin und Tyrosin eluiert. Zur quantitativen Bestimmung wurde eine Ab-

schätzung des Anteils durch Vergleich mit stabilen Aminosäuren durchgeführt.

Das auf der folgenden Seite abgebildete Elutionsprofil zeigt die Elution der basischen Aminosäuren von der kurzen Trennsäule. Die in geringer Konzentration nach Galaktosamin eluierte Komponente kann als Glucosamin angesehen werden, da die Hexosamine in dieser Reihenfolge zusammen eluiert werden.

Die Identifizierung von Galaktosamin steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von HAAS¹⁶⁾, der in den von ihm isolierten Glycopeptiden keine Hexosamine nachweisen konnte. Aufgrund der hier beschriebenen Analysen des gesamten Apoproteins besteht die Wahrscheinlichkeit, daß in anderen Bereichen des Proteinmoleküls dennoch N-glycosidische Bindungen existieren, vor allem, da der hier ermittelte Anteil von 2 % Galaktosamin im Vergleich zur nachgewiesenen Gesamtkohlenhydratmenge gering ist.

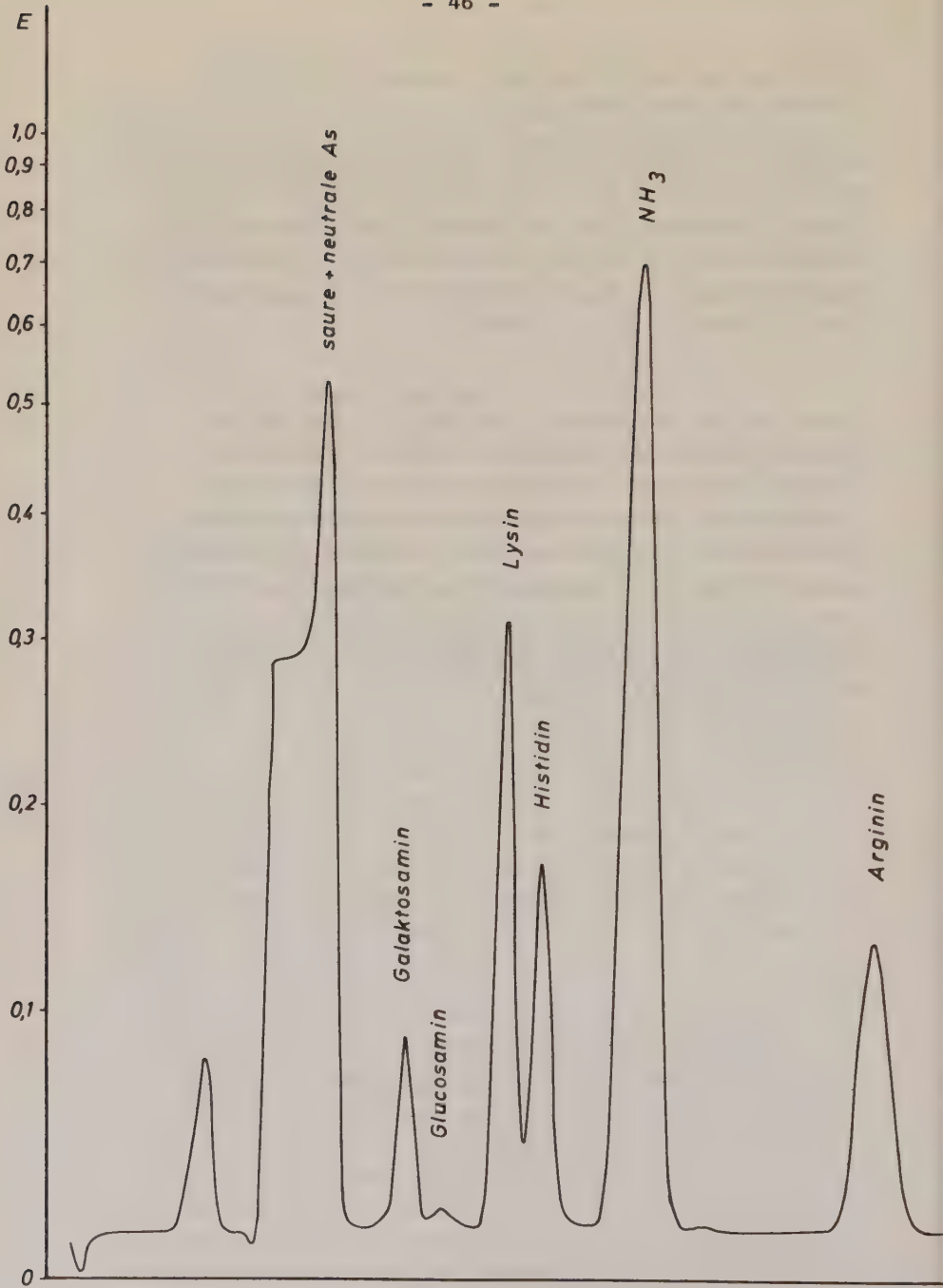


Abb. 16

Elutionsprofil d. bas. Aminosäuren, Mandel-D-Oxn Iso III

4.7 Aminosäurenanalysen der S-carboxymethylierten Peptide von Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzym II

Die Trennung der Peptide erfolgt mithilfe der kontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Methode wird bei den präparativen Trennungsversuchen beschrieben.

Die Peptide werden nach der im vorigen Kapitel dargelegten Methode hydrolysiert. Wegen der geringen Substanzmengen wird auf eine Serie unterschiedlicher Hydrolysezeiten verzichtet, und die säulenchromatographischen Trennungen der Aminosäuren am BECKMAN MULTICHROM werden nach der Einsäulenmethode unter Verwendung eines verlängerten Coils und einer 16 mm Durchflußküvette im Photometer durchgeführt.

In Vorversuchen wurde nachgewiesen, daß die Isolierung der Peptide aus Polyacrylamidgel das Ergebnis der Analysen nicht beeinflußt, und daß eventuell trotz Zentrifugation der Lösung eingeschleppte Gelteilchen die Hydrolyse und Aminosäurenanalyse nicht stören.

Die quantitative Ausbeute bei der Elution der Peptide aus Polyacrylamidgel wurde nicht untersucht. Aufgrund der guten Möglichkeit zur Immobilisation von Enzymen in Polyacrylamidgel⁴⁶⁾ muß besonders bei den Fraktionen mit höherer Molekülmasse mit erheblichen Verlusten gerechnet werden.

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Aminosäurenanalysen. Die Peptidfraktionen 5 und 6 sowie 3 und 4 wurden aufgrund ihrer geringen Abstände im Trenngel gemeinsam isoliert und analysiert.

Tabelle 5

Anteile der sauren, neutralen und basischen Aminosäuren
im sauren Hydrolysat von Peptiden des Mandel-D-Oxynitri-
lase-Isoenzym II

(Chromatographie: 1-Säulenmethode)

Aminosäure	P. 1	P. 2	P. 3/4	P. 5/6	P. 8	P. 9	P. 10
CM-Cystein	0,8	0,4	0,5	0,4	0,2	0,9	0,4
Asparaginsäure	11,0	10,3	10,9	10,0	9,7	8,3	8,1
Threonin	7,4	6,6	7,1	6,8	6,2	5,6	8,2
Serin	10,1	12,8	11,0	11,9	13,6	15,6	11,8
Glutaminsäure	10,2	11,2	9,0	8,8	10,4	11,7	6,8
Prolin	5,7	4,0	6,0	6,3	4,7	4,1	6,0
Glycin	14,4	16,4	13,2	12,3	14,8	16,7	12,5
Alanin	6,5	6,3	6,1	5,9	5,2	6,0	6,0
Cystein	+	+	+	+		+	+
Valin	7,0	6,2	6,6	6,6	5,6	4,7	6,2
Methionin	0,4	0,6	0,7	0,8	0,6	0,3	1,1
Isoleucin	3,2	3,2	3,6	3,8	3,6	3,0	4,1
Leucin	9,2	7,0	8,3	8,9	8,0	5,8	9,6
Galaktosamin	+	+	+	+	+	+	+
Tyrosin	1,5	2,4	2,4	2,5	1,5	0,9	3,0
Phenylalanin	3,8	3,5	5,2	5,3	4,3	3,5	5,2
Histidin	2,0	0,6	2,7	2,8	3,1	3,2	3,4
Lysin	3,4	5,5	4,0	4,0	5,8	7,2	4,4
Arginin	3,2	3,1	2,9	3,0	2,8	2,4	3,1

+ geringe Mengen

P. für Peptidfraktion

Anteile in Mol %

Die in Tabelle 5 zusammengestellten Analysenergebnisse zeigen zwischen den verschiedenen Peptidfraktionen signifikante Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung.

Gemeinsam sind allen Peptiden die hohen Anteile der Aminosäuren Asparaginsäure (Asparagin), Serin und Glycin. Auch Glutaminsäure (Glutamin) tritt in hohen, aber unterschiedlichen Anteilen auf. Methionin und S-Carboxymethylcystein sind überall nur in geringer Menge vorhanden.

Unterschiede von mehr als 2 Mol % treten bei Prolin und Tyrosin, von etwa 3 Mol % bei Asparaginsäure und solche von etwa 4 Mol % bei Serin, Glutaminsäure, Glycin, Leucin und Lysin auf.

Aufgrund der hohen Molekülmassen sind in den Peptiden wie in den Apoproteinen alle normalen Aminosäuren vertreten. Die leichteren Spaltprodukte ließen als einzige stärkere Unterschiede, besonders auch das Fehlen einzelner Aminosäuren erwarten. Aufgrund der unscharfen Bande in der Elektrophorese kann aber die Peptidfraktion 1 ein Gemisch verschiedener, leichter Bruchstücke sein; hier müßte eine Endgruppenanalyse Klarheit bringen.

Die Aminosäureanalysen der Peptide zeigen unterschiedliche und eindeutige Ergebnisse, die bei den einheitlichen Fraktionen Aussagen über die Zahl der Spaltstellen für enzymatische Hydrolysen zur Gewinnung kleinerer Peptide ermöglichen.

5. Präparative Trennung der Peptide

Die gefriergetrockneten S-carboxymethylierten Peptide von Mandel-D-Oxynitrilase sind in Puffern ohne Detergentien unlöslich. Gleiches gilt für die Bromcyan-peptide. Für die präparative Trennung ergeben sich daraus erhebliche Schwierigkeiten.

Die Präparate lösen sich nach längerem Rühren meist ohne Rückstand in Puffern mit Zusatz von 1 % Natriumdodecylsulfat, in 8 M Harnstofflösung, 50 % Essigsäure, 50 % Ameisensäure und in verdünnten Mineralsäurelösungen. Die Peptide sind in Formamid nur geringfügig, dagegen in Dimethylsulfoxid leicht und ohne Rückstand löslich.

5.1 Chromatographie der Peptide an Dextrangel

Nach Durchführung einer Versuchsreihe mit verschiedenen Sephadextypen und Essigsäurekonzentrationen erweist sich die Chromatographie an SEPHADEX G-100 fine, äquilibriert mit 50 % Essigsäure als geeignete Methode, eine Fraktionierung der Peptide in Gruppen mit hohem, mittlerem und niedrigen Molekülmassen zu erreichen. Es werden Fraktionen erhalten, die ein bis mehrere Peptide der verschiedenen Größenordnungen enthalten.

Die ungenügende Trennung beruht auf der auch in 50 % Essigsäure immer noch sehr starken Aggregationsneigung der Peptide. Eine Erhöhung der Säurekonzentration bewirkte durch die stärkere Schrumpfung des Dextrangels keine Erhöhung des Trenneffekts.

Zur Verbesserung der Trennung und Gewinnung reiner Peptidfraktionen ist eine Rechromatographie der Elutionsfraktionen der Chromatographie an SEPHADEX erforderlich. Bei Verfügbarkeit größerer Peptidmengen können die Trennungen durch Versuchsreihen mit BIOGEL oder CONTROLLED PORE GLASS verbessert werden.

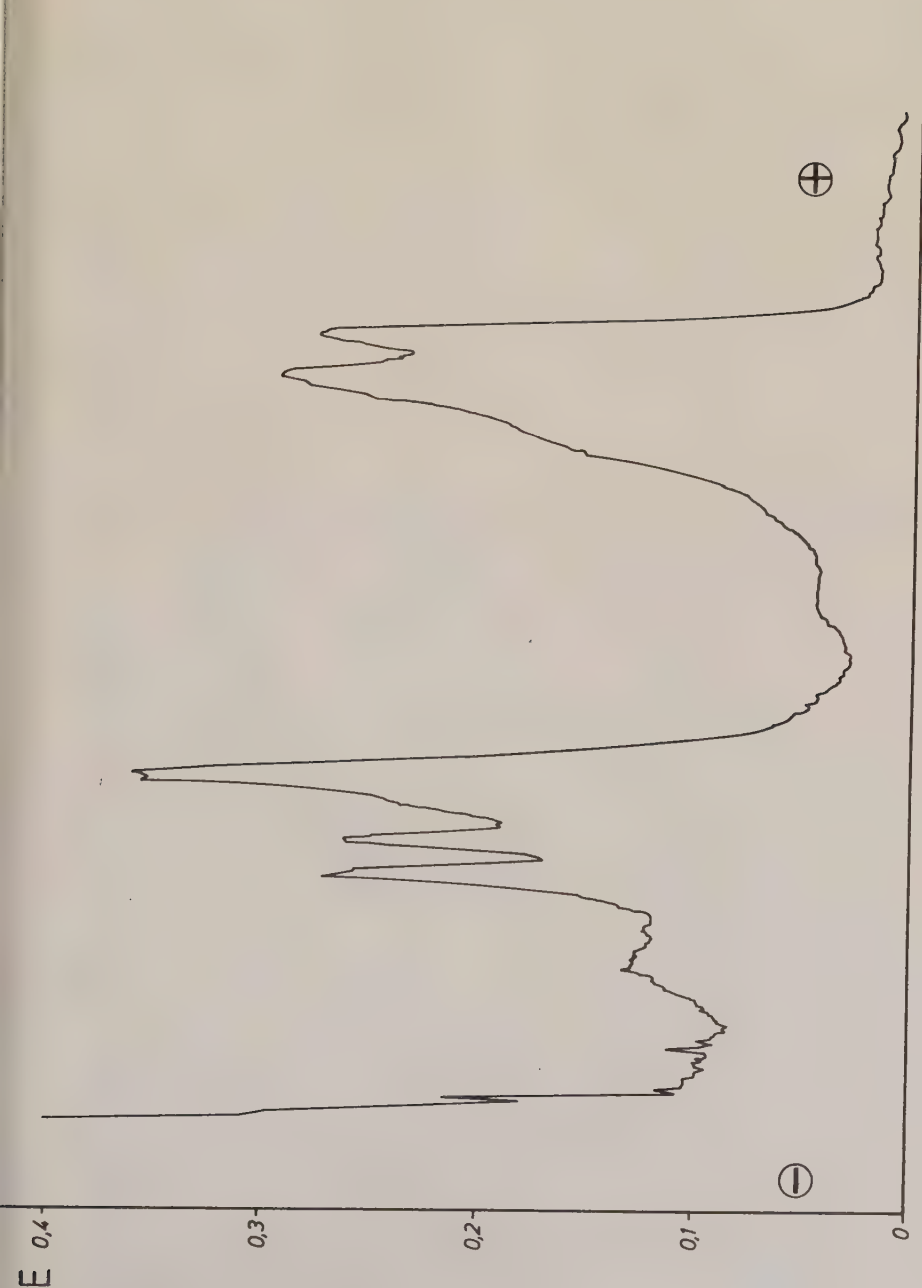


Abb. 17

Densitogramm der Bromocyanpeptide, Mandel-D-Oxynitrilase Isoenzym II

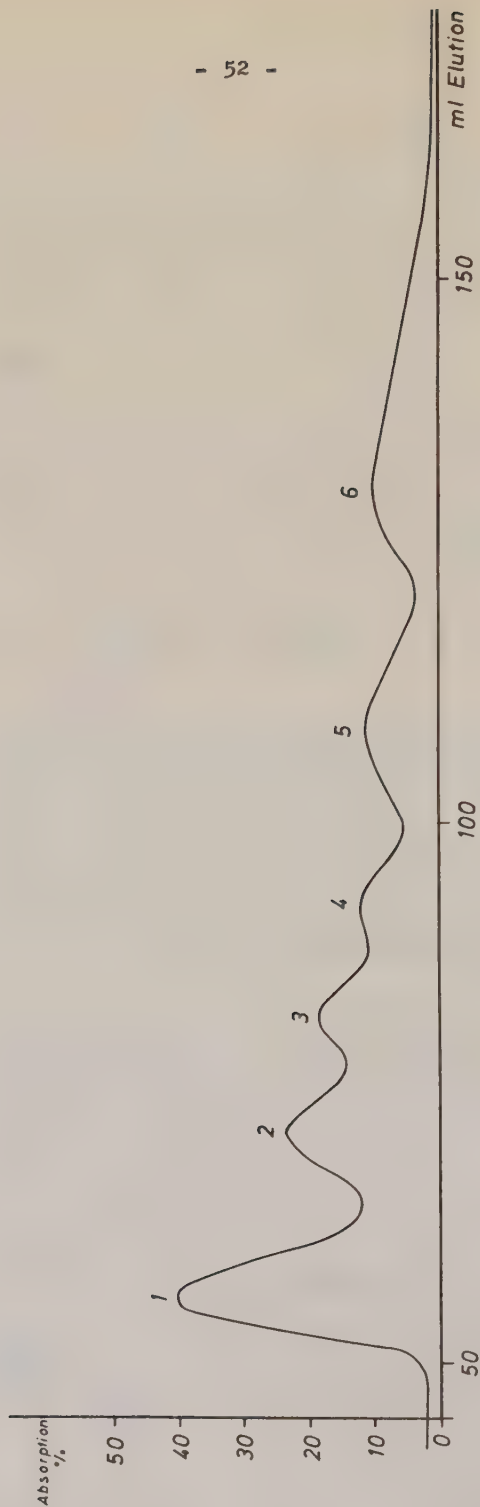


Abb. 18
 Elutionsprofil der Bromcyanpeptide
 Gelfiltration an SEPHADEX G-100

Abb. 19

Densitogramm der Brom-
cyan-Peptide Fraktion 1

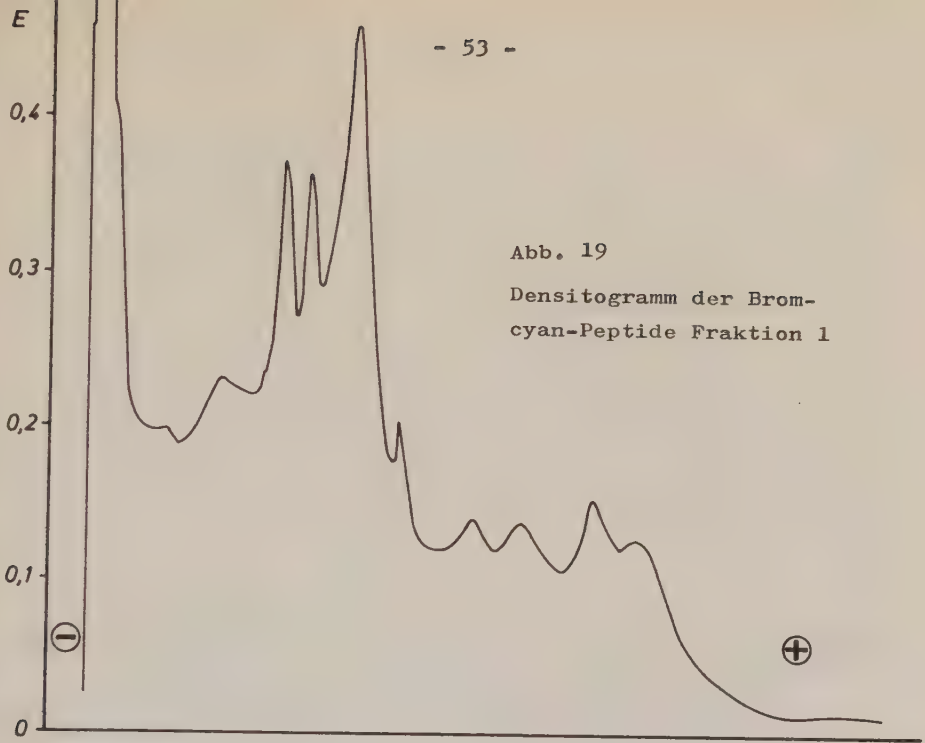
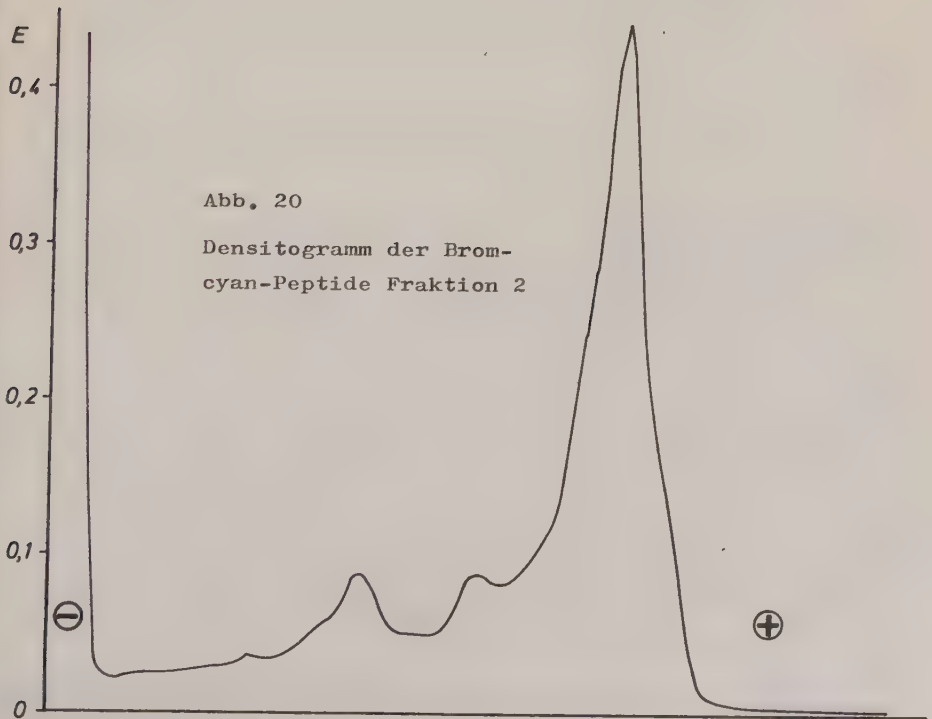


Abb. 20

Densitogramm der Brom-
cyan-Peptide Fraktion 2



E

0,4

0,3

0,2

0,1

0

Abb. 21

Densitogramm der Brom-
cyan-Peptide Fraktion 3



E

0,4

0,3

0,2

0,1

0

Abb. 22

Densitogramm der Brom-
cyan-Peptide Fraktion 5



Das abgebildete Elutionsprofil zeigt die Trennung von 10 mg Bromcyanpeptiden von Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzym II. Die Peptide werden chromatographiert an SEPHADEX G-100, äquilibriert mit 50 % Essigsäure, Säulenmaße 100 x 1 cm.

Die Pherogramme der eluierten Fraktionen geben Aufschluß über den Trenneffekt. Nur das leichteste Peptid wird in reiner Form gewonnen, in den anderen Peaks liegen aufgrund der Elektrophoreseergebnisse Gemische von Peptiden ähnlicher Molekülmassen vor.

Chromatographische Trennungen an Dextrangel mit 8 M Harnstofflösung oder flüchtigen Puffern mit 1 % Natriumdodecylzusatz bewähren sich nicht. Der Trenneffekt ist, auch bei Variation der SEPHADEX-Typen, geringer und neue, größere Probleme ergeben sich hinsichtlich Wiedergewinnung und Reinigung der Peptide aus einem Vielfachen an Detergentien.

5.2 Trennung der Peptide an CONTROLLED PORE GLASS

5 mg S-carboxymethylierte Peptide des Apoproteins von Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzym II werden an CPG-10/240 A, Körnung 200 - 400 mesh, Porendurchmesser 257 Å (Lieferant: SERVA), Säulenmaße 90 x 0,5 cm, äquilibriert mit 50 % Essigsäure, getrennt.

Die Chromatographie an CPG führt zu ähnlichen Ergebnissen wie die Trennung an SEPHADEX, die Fraktionen sind aber stärker verschmiert. Leider konnten aufgrund des Preises von CPG keine Versuchsreihen mit Variation von Porengröße und Trennbedingungen durchgeführt werden, so daß die Versuche mit dieser erfolversprechenden Methode nur als Vorversuche anzusehen sind.

5.3 Präparative Trennung der S-carboxymethylierten Peptide durch kontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

5.3.1 Trennverfahren

Für die präparativen Trennungen der Peptide in dichtem SDS-Polyacrylamidgel ist die Disk-Elektrophorese-Apparatur COLORA ELEKTROPHOR nach NEES ungeeignet. Zwischen Gel und Trennkammer treten bei der Polymerisation Spalten auf, die zu Proben- und Pufferdurchfluß führen und das elektrische Feld bei der Elektrophorese erheblich stören. Das Elutionssystem des Geräts versagt bei der langandauernden Elektrophorese mit dichtem Gel durch Blasenbildung völlig, sodaß eine selbstgebaute analytische 12-Säulenapparatur für die präparativen Trennungen eingesetzt wird.

Als Voraussetzung für gleichartige Trennungen wird das Trennverfahren standardisiert. Säulendurchmesser, Gelkonzentration, Puffer, Trennstrecke, Substanzmenge, Probenstabilisierung und Stromstärke werden in Vorversuchen optimiert und dann bei jeder Trennung konstant eingehalten. Bei der gewählten Methode ist die Luftkühlung der Apparatur ausreichend. Durch diese Arbeitsweise wird eine sehr gute Konstanz der jeweiligen Laufstrecken erzielt. Die Reproduzierbarkeit ist Voraussetzung für die weiteren Arbeitsschritte.

5.3.2 Identifizierung und Wiedergewinnung der Peptide

Bei jeder Trennung werden 0,5 mg Peptide pro Säulchen, Maße 10 x 0,6 cm, aufgetragen und nach dem standardisierten Verfahren aufgetrennt. Der Elektrophoresepuffer (Natriumphosphatpuffer 0,1 M, pH 7) enthält 0,1 % Natriumdodecylsulfat, die Stromstärke beträgt 8 mA pro Gelsäule.

11 Gelsäulchen werden unmittelbar nach der Trennung eingefroren und die 12. mit Amidoschwarz 10 B in Wasser/Methanol/Eisessig-Lösung gefärbt und fixiert.

Eine unmittelbare Anfärbung der Peptide mit Fluoreszenzfarbstoff nach HARTMAN und UDENFRIEND⁴⁷⁾ ist zwar möglich, führt aber nicht zu einer ausreichenden Fluoreszenz der schwachen Banden. Durch den SDS-Zusatz sind die hydrophoben Bereiche der Peptide verändert und für eine ausreichende Adsorption des Farbstoffs (Anilin-naphthalin-sulfonat) nicht mehr im gleichen Maße geeignet. Nur starke Banden werden ausreichend sichtbar, während besonders die schwächeren Banden kleinerer Peptide unsichtbar bleiben.

Nach elektrophoretischer Entfernung des überschüssigen Amidoschwarz 10 B sind die Gelsäulen bei der hier angewandten Methode in Länge und Durchmesser unverändert, sodaß die Peptidbanden der aufbewahrten Säulchen mit Hilfe der gefärbten Banden leicht aufgefunden und selektiv herausgeschnitten werden können. Für die weitere Verarbeitung werden die Gelabschnitte mit den verschiedenen Peptiden aus 10 Läufen getrennt gesammelt und gefroren aufbewahrt.

Die Methode muß durch Verwendung geeigneter Farbstoffe weiter verfeinert werden, sodaß eine unmittelbare Färbung und Isolierung der Peptide, wie von V. NEUHOFF⁴⁸⁾ beschrieben, direkt nach der Elektrophorese möglich wird. Diese Methode soll eine Trennung auch von dicht aufeinanderfolgenden Peptiden ermöglichen.

5.3.3. Elution der Peptide aus dem Polyacrylamid-Gel

Vorversuche zur Hydrolyse von Peptiden zusammen mit dem Acrylamid-Gel zeigen, daß eine Entfernung des Gels erforderlich ist; der geringe Phosphat- und SDS-Gehalt stört Hydrolyse und Chromatographie nicht.

Für eine möglichst quantitative Elution der Peptide aus dem Gel ist eine überaus feine Zerkleinerung und Quellung des Acrylamidgels und die optimale Löslichkeit der Peptide erforderlich.

Unter Verwendung von Spritzen und feinen Kanülen wird das Gel zerkleinert, zur Quellung der feinen Partikel und Verbesserung der Löslichkeit der Peptide in 0,1 N HCl aufgeschlämmt und unter Verwendung eines Rührers mehrfach eluiert. Die Elution ist sicher nicht vollständig, eine quantitative Untersuchung wurde aber nicht durchgeführt. NEUHOFF⁴⁹⁾ beschreibt eine elektrophoretische Methode zur Elution kleinster Proteinmengen aus Acrylamid-Gel.

Der Einsatz von 0,1 N HCl ist hier unbedenklich, da das Material für die Hydrolyse bestimmt ist. Bei anderer Zielsetzung, z.B. bei Isolierung nativer Enzyme oder Gewinnung von Präparaten für die enzymatische Spaltung ist wesentlich größere Vorsicht gegenüber Mineralsäure dieser Konzentration erforderlich.

Zur schonenden Elution nativer Proteine empfiehlt sich die Methode von WEBER und OSBORN³⁰⁾, die die Elution mit 0,1 % SDS-Lösung durchführen. Bei anschließender Fällung der Proteine in 90 % eisgekühlter Acetonlösung bleibt SDS überwiegend in Lösung.

Die eluierten Peptidfraktionen werden zentrifugiert, im Exsikkator über NaOH getrocknet und anschließend nach der angegebenen Methode hydrolysiert.

6. Diskussion

Die D-Oxynitrilasen der Prunoideen und Pomoideen zeigen artspezifisch erhebliche Unterschiede, die sich in den elektrophoretischen Eigenschaften, in verschiedenen Molekülmassen, der Aminosäuresequenz sowie Stabilität und Aktivität dokumentieren. Die interspezifischen Unterschiede sind im Vergleich zu anderen Proteinen und unter Berücksichtigung des geringen phylogenetischen Alters der D-Oxynitrilase - das Enzym hat nur sehr geringe Verbreitung - sehr erheblich. Die intraspezifischen Unterschiede zwischen den Isoenzymen sind dagegen geringer als bisher angenommen wurde.

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß Apfel- und Mandel-D-Oxynitrilase gegenüber Gefriertrocknung verschiedene Stabilität aufweisen. Während das Enzym von Malus-Arten kaum leidet, wird die Mandel-D-Oxynitrilase überwiegend gespalten. Diese Beobachtungen zeigen, daß die Enzyme sich nicht nur in der Aminosäuresequenz, sondern auch in der Tertiärstruktur erheblich unterscheiden müssen. Dies bewirkt bei Apfel-D-Oxynitrilase nicht nur eine größere Stabilität, sondern auch höhere Aktivität.

Die Pherogramme von gefriergetrocknetem Mandel-D-Oxynitrilase-Holoenzym und gefriergetrocknetem, durch schonende Spaltung nach STRITTMATTER dargestelltem, nativem Apoprotein dokumentieren die Bedeutung des FAD für Ausbildung und Stabilität der Tertiärstruktur des Enzyms. Das Apoprotein ist wesentlich empfindlicher und wird durch Gefriertrocknung fast völlig zerstört; in Lösung neigt es stark zur Aggregation. Die Aktivitätsverluste beim Trocknen und Gefriertrocknen des Enzyms sind nicht nur durch Ablösung des FAD vom Apoprotein, sondern auch durch die Spaltung des Apoproteins zu erklären.

Die Spaltung erfolgt an wenigen Peptidbindungen. Die Reproduzierbarkeit der Bandenmuster in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese beweist eine Spaltung an bestimmten Positionen, wahrscheinlich an den gegen saure Hydrolyse besonders empfindlichen Peptidbindungen von Asparaginsäure. Für diese Theorie spricht nicht nur die leichte Spaltbarkeit dieser Bindungen durch Hydrolyse bei geringer Protonenkonzentration, sondern auch die Beobachtung, daß sich die Molmassen von nieder- und hochmolekularen Peptiden in Paaren zur Molmasse des Apoproteins ergänzen. Der Beweis muß noch durch Endgruppenanalysen der Peptide erbracht werden.

Die Molekülmassen der Peptide und die Stabilität des Holoenzym und des nativen Apoproteins gegenüber Detergentien - die Aktivität von Mandel-Isoenzym II sinkt nach 6-stündiger Inkubation in 1 % Natriumdodecylsulfatlösung nur um 20 %, in 8 M Harnstofflösung um 35 % (Messung: 5-Minuten-Drehwert im wässrigen Dreh-test) - zeigen, daß die Proteinmoleküle nicht in Untereinheiten zerfallen, sondern durch Hydrolyse von Peptidbindungen in Peptide gespalten werden.

Ein Vergleich der Peptidbanden in den Pherogrammen von S-carboxymethyliertem Apoprotein der Mandel-Isoenzyme I und II ergibt große Übereinstimmung, was große Ähnlichkeit der Apoproteine in ihrer Aminosäuresequenz bedeutet. Dieses Ergebnis wird durch die Bestimmung der Anteile der verschiedenen Aminosäuren am Aufbau der Proteine bestätigt. Die Aminosäureanalysen zeigen zwischen den Apoproteinen der Isoenzyme I, II und III fast völlige Übereinstimmung.

Die Existenz von mehreren Isoenzymen mit eindeutigen Unterschieden im IEP, den elektrophoretischen Eigenschaften und der Enzymaktivität ist auch bei der hier nachgewiesenen Übereinstimmung der Primärstruktur möglich, da bereits der Austausch von 1 oder 2 Aminosäu-

reresten erheblichen Einfluß auf die Eigenschaften haben kann, wenn z. B. unpolare gegen basische oder saure polare Reste ausgetauscht werden. Solche Änderungen haben auch Folgen für die Tertiärstruktur, wenn sie nicht weitgehend durch kovalente Bindungen fixiert ist.

Isoenzyme mit geringfügigen Unterschieden in der Aminosäuresequenz setzen die Existenz von verschiedenen, geringfügig mutierten Genen in einem Chromosomensatz voraus. Dies darf nicht einfach durch die nachgewiesene Polyploidie⁵⁰⁾ der Prunoideen und Pomoideen erklärt werden, da durch Reduktionsteilung und nachfolgende Befruchtung Sämlinge mit unterschiedlichem Isoenzymmuster entstehen müßten. Vielmehr muß aufgrund der artspezifischen Konstanz der Isoenzymmuster Genduplikation mit nachfolgender geringfügiger Mutation der duplizierten Gene angenommen werden. Damit liegen die Gene zwangsläufig in Kopplungsgruppen vor und werden gemeinsam vererbt. Die unterschiedlichen Mengen der drei Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzyme (Iso I 40 %, Iso II 53 %, Iso III 7 % Anteil)¹²⁾ können durch unterschiedliche Syntheseleistung (Promotorwirkung, entwicklungsabhängige Genaktivierung) gesteuert werden. Dieses Problem wurde bereits früher diskutiert.^{7, 10)}

Die Ergebnisse der Aminosäureanalysen und die Elektropherogramme erlauben aber auch eine andere Interpretation: Aufgrund der großen Übereinstimmung ist es möglich, daß die Isoenzyme eine identische Primärstruktur besitzen, sich aber durch unterschiedliche Knüpfung der Disulfidbrücken oder Ausbildung verschiedener anderer Haftpunkte in der Tertiärstruktur unterscheiden. Hier könnte sogar dem FAD bei der Bildung des Holoenzym eine entscheidende Rolle zufallen.

Bei dieser Art der Isoenzymbildung, wie sie z.B. bei Malatdehydrogenase⁵¹⁾ gefunden wurde, entstehen Unterschiede zwischen den Proteinmolekülen bei gleicher Aminosäuresequenz nur durch Variation der Tertiärstruktur. Die isomeren Enzyme nennt man Struktur-Isoenzyme.

Aufgrund der Ergebnisse von G.HAAS¹⁶⁾ können die D-Oxynitrilase-Isoenzyme nicht durch unterschiedliche Neuraminsäure- oder Sialinsäure-Anteile, wie sie für alkalische Phosphatase-Isoenzyme von *E. coli* nachgewiesen wurden, entstehen. HAAS konnte zwar unterschiedliche Kohlenhydrat-Anteile, aber keine Neuramin- oder Sialinsäure nachweisen, und damit kann die für das unterschiedliche elektrophoretische Verhalten voraussetzende Ladungsdifferenz nicht diesen Kohlenhydratderivaten zugeschrieben werden.

Die Berücksichtigung der geringen Differenzen in den Aminosäureanalysen, die fehlende quantitative Bestimmung von Tryptophan, das zusammen mit Tyrosin für die unterschiedliche Absorption der Isoenzyme im UV-Bereich verantwortlich sein muß¹²⁾, die geringfügigen Unterschiede in Fingerprintanalysen der tryptischen Peptide⁷⁾ und die SDS-Polyacrylamid-Pherogramme sprechen für geringe Abweichungen in der Primärstruktur und damit für die Existenz multipler, geringfügig mutierter D-Oxynitrilase-Gene.

Der Austausch von sehr wenigen Aminosäureresten bewirkt, zusammen mit dem allosterischen Effekt des Coenzyms FAD, eine geringfügige Änderung von Ladung und Tertiärstruktur der Isoenzyme. Diese einfachste Möglichkeit zur Bildung von Isoenzymen wurde bei den Carboanhydrase-Isoenzymen aus menschlichen Erythrocyten nachgewiesen.⁵²⁾

Die Trennung der durch Gefriertrocknung erhaltenen Peptide erweist sich aufgrund der schlechten Löslichkeit der Präparate als schwierig. Die säulenchromatographische Trennung in 50 % Essigsäure erscheint bei mehrfacher Rechromatographie der Fraktionen an geeigneten Materialien wie gekörntem Acrylamidgel oder CPG möglich, Voraussetzung für die Optimierung dieser Methode und ihre Anwendung sind relativ große Peptidmengen.

Als optimales Trennverfahren erweist sich die kontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Nach dieser Methode werden reproduzierbare, saubere Trennungen der Peptidfraktionen erreicht. Durch Kombination von Säulenchromatographie zur Vorfraktionierung und anschließender elektrophoretischer Trennung der Fraktionen mit entsprechender Anpassung der Gelkonzentrationen könnte eine Verbesserung zur Trennung größerer Peptidmengen erreicht werden, da die normale präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgrund der hohen Geldichte und der sehr langen Laufzeiten versagt.

Die unmittelbare Färbung oder Fluoreszenzmarkierung⁵³⁾ der Peptide war nicht möglich, da eine Methode zur Gewinnung enzymatisch spaltbarer großer Peptide erarbeitet wurde. Eine reversible Färbung oder Fluoreszenzmarkierung der Peptide vor oder nach der elektrophoretischen Trennung würde die Identifizierung und Wiedergewinnung sehr verbessern.

7. Zusammenfassung

Aminosäurenanalysen und Eigenschaften der Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzyme zeigen nur geringe Unterschiede, das beweist eine weitgehende Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz.

Die Mandel-D-Oxynitrilase-Apoproteine von Isoenzym I und II werden bei Gefriertrocknung unter Bildung reproduzierbarer Peptidfraktionen gespalten. Der für die Spaltung postulierte Reaktionsmechanismus geht von einer Protonierung des Amidstickstoffs aus und führt durch nucleophilen Angriff der freien β -Carboxylgruppe von Asparaginsäure am eigenen oder benachbarten C-Atom der Peptidbindung unter Anhydridbildung zur Substitution von Peptidresten. Dieser Mechanismus basiert auf dem bei der partiellen Hydrolyse von Proteinen mit stark verdünnter Säure nachgewiesenen Auftreten von Anhydrid als Zwischenprodukt und dem schnellen Auftreten freier Asparaginsäure im Hydrolysat; der Beweis durch Endgruppenanalysen der Peptide steht noch aus.

D-Oxynitrilase-Holoenzym ist in der Gefriertrocknung wesentlich stabiler als Apoprotein. Die Ursachen sind einerseits in der unterschiedlichen Präparation - das Holoenzym wird im Gegensatz zum Apoprotein vor Gefriertrocknung nicht protoniert, sondern nach Entsalzung aus neutraler Lösung lyophilisiert - und andererseits im Stabilisierungseffekt des FAD auf die Tertiärstruktur des Proteins (allosterischer Effekt) zu suchen, wobei auch die Bindung des FAD selbst die Beweglichkeit einzelner Asparaginsäure-Seitengruppen beeinflussen kann.

Die reproduzierbaren Peptidbanden-Muster in den Programmen verschiedener Apoprotein-Präparationen be-

stätigen im Vergleich die weitgehende Identität der Primärstruktur von Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzym I und II.

Starke Unterschiede zeigen sich beim Vergleich von Mandel- und Apfel-D-Oxynitrilase. Die Peptidbandenmuster der Elektropherogramme zeigen keine Übereinstimmung. Das Enzym aus Malus-Arten ist gegenüber der Spaltung durch Gefriertrocknung stabiler, was aufgrund des um 2 Mol % geringeren Asparaginsäuregehaltes unter Zugrundelegung des postulierten Reaktionsmechanismus zu erwarten ist und ihn indirekt bestätigt. Untersuchungen über das Verhältnis von Asparaginsäure zu Asparagin in beiden Enzymen könnten das unterschiedliche Ausmaß der Spaltung weiter erklären.

Eine Methode zur analytischen und präparativen Trennung der S-carboxymethylierten Peptide von Mandel-D-Oxynitrilase-Apoprotein aus der partiellen sauren Hydrolyse durch Gefriertrocknung und der Bromcyan-spaltung mithilfe der kontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird erarbeitet und beschrieben. Aminosäureanalysen, Molmassenbestimmung und elektrophoretische Eigenschaften dienen zur Charakterisierung der Peptide.

Die Versuchsergebnisse zeigen die weitgehende Identität der Mandel-D-Oxynitrilase-Isoenzyme und bestätigen, zusammen mit früheren Untersuchungen, die Existenz von geringfügig mutierten, multiplen D-Oxynitrilase-Genen, die die Synthese der jeweiligen Primärstruktur mit nur geringen Unterschieden determinieren.



II Experimenteller Teil

1. Darstellung von Mandel- und Apfel-D-Oxynitrilase

Das im folgenden geschilderte Verfahren basiert auf den Arbeiten von BENTHIN⁴⁾, ESCHENHOF⁵⁾ und BECKER⁶⁾ in der Modifizierung von ASCHHOFF¹²⁾ und MEHNER¹⁹⁾.

1.1 Ausgangsmaterial

Zur Isolierung der Mandel-D-Oxynitrilase standen für diese Arbeit größere Mengen Bittermandelkleie zur Verfügung, die ohne weitere Behandlung mit Wasser extrahiert werden konnte. Bei der Darstellung aus Mandeln sind die Samen vom Sklerenchym zu befreien, nach Einweichen in handwarmem Wasser werden die Samenschalen entfernt und die Mandeln an der Luft bei Zimmertemperatur getrocknet.

Apfelkerne werden im Mixer nur grob zerkleinert und die Samenschalen möglichst weitgehend herausgeblasen.

Das gereinigte Samenmaterial wird im Mixer zu Mehl zerschlagen und mit 1 Liter Petroläther (Kp 60-70) pro 100 g Samenmehl 15 Stunden auf der Schüttelmaschine extrahiert, das entfettete Mehl abzentrifugiert und an der Luft getrocknet.

1.2 Extraktion der Enzyme

Die Extraktion des entfetteten Samenmehls verläuft am günstigsten mit 1000 ml Wasser pro 100 g Samenmehl bei pH 7,5 (eingestellt mit 6 N NH_3). Während der 12-stündigen Extraktion ist eine öftere Korrektur des pH-Wertes, besonders zu Beginn, erforderlich. Die Zunahme der Protonenkonzentration ist auf die Extraktion von Gerbsäuren aus den Samenschalen zurückzuführen. Wegen der denaturierenden Wirkung der Gerbsäuren auf Proteine ist die weitgehende Entfernung der Samenschalen

von Bedeutung.

Man zentrifugiert 1 h bei 2 500 U/min, bringt den Überstand mit 6 N Essigsäure auf pH 5,4 und läßt die ausfallenden, inaktiven Begleitproteine über Nacht im Kühlschrank absitzen. Erneutes Zentrifugieren von 1 Stunde bei 2 500 U/min ergibt einen klaren, gelblichen Rohextrakt.

Der Rohextrakt wird in einer Ultrafiltrationszelle (Fabrikat AMICON, Filter XM-50) bei einem maximalen N_2 -Druck von 4 kp/cm² eingeengt. M. KISSLINGER⁵⁴⁾ hat nachgewiesen, daß die Anfangsaktivität des Rohextrakts durch diese Ultrafiltration auf etwa 13 % absinkt. Ähnlich drastische Aktivitätsverluste habe ich¹⁰⁾ bei dem früher üblichen Trocknen des Äthanolgefällten Emulsins nachgewiesen. Zur Erhöhung der Ausbeute sollte in Zukunft auf die Ultrafiltration verzichtet und auf die Alkoholfällung zurückgegriffen werden.

Aus dem kalten (+2°C) Rohextrakt vom pH 5,4 wird bei der Alkoholfällung durch Zugabe des 4-fachen Volumens an kaltem (+2°C) 96 % Äthanol alles Protein ausgefällt. Der gelbliche Niederschlag wird nach Absitzen im Kühlschrank abzentrifugiert, das gefällte Präparat sollte zur Verminderung eventueller Denaturierung nicht zu lange unter Alkohol aufbewahrt und nach Aufnahme in Phosphatpuffer mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung umgefällt werden. In dieser Form kann das Material längere Zeit ohne merklichen Aktivitätsverlust im Kühlschrank (2-4°C) lagern.

1.3 Chromatographie an SEPHADEX G-100

Das Konzentrat der Ultrafiltration bzw. das mit 0,1 M Pyrophosphat-Puffer pH 7,5 gelöste Rohenzym wird 2-4 mal in 2 m langen Säulen an SEPHADEX G-100 normal

mit 0,1 M Pyrophosphatpuffer pH 7,5 chromatographiert. Nach der Elution erfolgt jeweils die Fällung der D-Oxynitrilasefraktion mit Ammoniumsulfat, Zentrifugation bei 16000 U/min.

Zur Reinheitsprüfung der Präparate dient die Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese L. ORNSTEIN⁵⁵⁾ und B.J. DAVIS⁵⁶⁾, eine ausführliche Darstellung der Methode gibt E. GERSTNER⁵⁷⁾. Erst nach viermaliger Chromatographie ist die D-Oxynitrilase in den Pherogrammen frei von Verunreinigungen; für Präparationen, die der Isoenzymtrennung unterworfen werden, reicht dreimalige Chromatographie an SEPHADEX G-100, aufgrund des Reinigungseffektes der nachfolgenden Gradientenelution an DEAE-Cellulose, aus.

Die D-Oxynitrilasekonzentration läßt sich aus dem molaren Extinktionskoeffizienten berechnen⁸⁾. Bei einem E_{460} -Wert von 0,15 enthält eine D-Oxynitrilase-Lösung 1 mg Enzym/ml.

1.4 Trennung der Isoenzyme

Ausführliche Darstellungen zur Fraktionierung der D-Oxynitrilase-Isoenzyme findet man bei ASCHHOFF¹²⁾ und GERSTNER⁵⁷⁾. Die Präparation des zur Trennung eingesetzten WHATMAN DE-32 Cellulose-Austauschers erfolgt nach Vorschrift des Herstellers, die Elution nach der Methode von GERSTNER, geringfügige Änderungen wurden in Teil I, 2.2 angegeben. Die Vergrößerung des Säulendurchmessers läßt eine Erhöhung der aufgetragenen Enzymmenge auf 400 mg pro Trennung zu. Durch Erhöhung des vorgelegten Anfangspuffervolumens (0,01 M Pyrophosphatpuffer pH 6,0) im Mischgefäß auf 2250 ml und der Durchflußgeschwindigkeit auf 25 ml/h, dabei wird im Vorratsgefäß 0,15 M Pyrophosphatpuffer

pH 6,0 eingesetzt, bleibt die ursprüngliche Trennqualität erhalten. Eine weitere Vergrößerung des Säulenquerschnitts erweist sich nicht als förderlich, da durch ungleichmäßigen Pufferdurchfluß die Tendenz zur Gassenbildung stark zunimmt.

Die Isoenzymfraktionen werden nach der Elution mithilfe der Disc-Elektrophorese auf ihre Reinheit geprüft, mit Ammoniumsulfat gefällt und im Kühlschrank aufbewahrt.

1.5 Spaltung der D-Oxynitrilase-Isoenzyme nach STRITTMATTER

Alle Operationen sind zur Vermeidung von Aggregationen im Bereich von 0 - 2°C durchzuführen.

10 ml D-Oxynitrilase-haltiger, 0,1 M Pyrophosphatpuffer pH 7,5 (10 - 15 mg Enzym/ml) werden mit 10 ml 3 M Kaliumbromid-Lösung vermischt. Nach Zugabe von 10 ml saurer, gesättigter Ammoniumsulfatlösung pH 1,6 (gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung im Verhältnis 3 zu 1 mit 1 N H_2SO_4 mischen, durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat mit dem Salz sättigen) fällt ein Niederschlag aus, der sofort 15 Minuten bei 4 000 U/min zentrifugiert wird.

Die überstehende, klare Lösung enthält FAD (starke Fluoreszenz im UV-Licht), der Niederschlag ist noch gelb gefärbt und kann erst nach erneutem Auflösen in Puffer und zweimalige Wiederholung der Spaltung vollständig von FAD befreit werden. Zur Entfernung der Säure vom Niederschlag, die Spaltungslösung hat pH 2,2, fällt man das Apoprotein nach Aufnahme in Pyrophosphatpuffer mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung um.

Der Umfällung schließt sich eine mehrtägige Dialyse bei 0 - 2°C gegen destilliertes Wasser an, nach jedem Wasserwechsel ist mit BaCl_2 auf Sulfat zu prüfen.

1.6 Aktivitätsbestimmung durch den wäßrigen Drehtest

Eine ausführliche Darstellung der verschiedenen Methoden zur Aktivitätsbestimmung der D-Oxynitrilase findet man in der Arbeit von E.GERSTNER⁵⁷⁾.

Der wäßrige Drehtest findet Anwendung, solange das Enzym noch durch Begleitproteine verunreinigt ist, da diese den alkoholischen Drehtest durch Denaturierung stören, ferner bei Verwendung von Detergentien, die in 50 % Äthanol nicht oder nur geringfügig löslich sind.

In ein 50 ml Fläschchen mit Schliffstopfen gibt man 22,5 ml 0,1 M Acetatpuffer pH 5,4, unterschichtet (Injektionsspritze mit langer Kanüle) mit 1 ml (10 mMol) Benzaldehyd (reinst, 3-fach unter N₂ destilliert) und fügt 1 ml Testlösung hinzu. Zuletzt gibt man mit einer gekühlten Pipette 0,5 ml (13 mMol) wasserfreie Blausäure hinzu.

Die Reaktion setzt mit dem Umschütteln ein. Nach 5 Minuten kräftigem Schütteln bei Zimmertemperatur wird das gebildete D-(+)-Mandelsäurenitril aus der trüben Reaktionsmischung mit 50 ml Chloroform extrahiert, die Chloroformphase mit wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet und durch ein Filter in eine Polarimeter-röhre überführt. Die Messung erfolgt bei Zimmertemperatur.

Die gemessenen Drehwinkel erlauben bei Kenntnis des Lösungsvolumens und der spezifischen Aktivität des reinen Enzyms die Berechnung des D-Oxynitrilase-Gehaltes bzw. der Aktivitätsminderung durch Detergentien. Drehwerte verschiedener D-Oxynitrilasen aus *Prunoideen* und *Pomoideen* findet man unter (57).

2. Darstellung von reduziertem und S-carboxymethyliertem Apoprotein

2.1 Bestimmung freier SH-Gruppen

p-Hydroxymercuribenzoat (PMB) wurde von HELLERMAN et al.⁵⁸⁾ als spezifisches Reagenz für Thiolgruppen eingeführt. P.D. BOYER⁵⁹⁾ entwickelte eine spektrophotometrische Methode, die in der Modifizierung von H. NEUMAN²¹⁾ angewandt wird.

Die Mercaptidbildung bei pH 7 ist von einer erheblichen Zunahme der UV-Absorption bei 250 nm begleitet, dies wird zur photometrischen Registrierung der Reaktion ausgenutzt.

Zu 1 ml 10^{-5} M D-Oxynitrilase-Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 wird schrittweise (je 0,2 ml) 1 ml 10^{-3} M PMB-Lösung, eingestellt auf pH 7,0, gegeben. Nach jeder Zugabe wird die Extinktion bei 250 nm gemessen, der Meßwert um die Verdünnung korrigiert und graphisch gegen das Volumen der zugegebenen Reagenzlösung aufgetragen.

Nach Korrektur der gemessenen Extinktionswerte ergibt sich keine Änderung bei Zugabe von PMB-Lösung zu Mandel-D-Oxynitrilase, was den Schluß erlaubt, daß im Enzym keine freien SH-Gruppen vorhanden sind.

Das gleiche Ergebnis wird nach Inkubation des Ferments in 1 % SDS- und 8 M Harnstoff-Lösungen erhalten, sodaß auch keine schwer zugänglichen Thiolgruppen vorhanden sein dürften.

In der Disc-Elektrophorese zeigen die PMB-behandelten Isoenzyme keine Veränderung des elektrophoretischen Verhaltens.

2.2 Reduktion und S-carboxymethylierung des Apoproteins

Die Disulfidbrücken im Apoprotein werden durch Mercaptoäthanol gespalten und die freien Thiolgruppen anschließend mit Iodessigsäure alkyliert. Bei dieser Methode nach CRESTFIELD et al.²²⁾ ist Mercaptoäthanol gegenüber Iodessigsäure im Überschuß vorhanden. Da die SH-Gruppen am schnellsten alkyliert werden, reagiert die Iodessigsäure zuerst mit ihnen und danach mit Mercaptoäthanol. Dadurch wird die andernfalls mögliche Alkylierung des Methionins minimal gehalten.

Zu 10 mg Apoprotein, die im Stickstoffkölbchen unter einer N₂-Barriere gehalten werden, gibt man 1,2 g deionisierten, rekristallisierten Harnstoff, 0,4 ml 5 % ÄDTE-Lösung (50 mg/ml), 1,0 ml 1,5 M Tris/HCl-Puffer pH 8,6 (5,23 g Tris + 9 ml 1 N HCl gelöst zu 30 ml Endvolumen mit dest. Wasser) sowie 0,1 ml β -Mercaptoäthanol.

Der Kolben wird unter Luftausschluß verschlossen und das Reaktionsgemisch 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Reduktion gibt man eine frisch bereitete Lösung von 0,268 g Iodessigsäure in 1,0 ml 1N NaOH zur Alkylierung in den Kolben, der jetzt zur Vermeidung von Jodbildung durch Umwickeln mit Aluminiumfolie vor Lichteinwirkung geschützt sein muß.

15 Minuten nach Zugabe der Iodacetat-Lösung wird der gesamte Kolbeninhalt auf eine Säule von 4 x 60 cm, gefüllt mit SEPHADEX G-25 coarse, äquilibriert mit 50 % Essigsäure, gegeben. Auch diese Säule ist zum Lichtausschluß mit Aluminiumfolie umwickelt. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 20 ml/h werden 10 ml-Fractionen gesammelt und das S-carboxymethylierte Protein anschließend gefriergetrocknet.

3. Spaltung des S-carboxymethylierten Apoproteins mit Bromcyan

Bromcyan reagiert mit dem Schwefel in der Thioäther-Seitenkette von Methionin. Aufgrund ihrer großen Spezifität und dem meist geringen Methioningehalt der Proteine liefert die Bromcyan-Spaltung meist große Peptide, die enzymatisch weiter hydrolysiert werden können.

Die Methode führt zu einer Spaltung der Peptidbindung, die die Carboxylgruppe des Methionins enthält. Alle so erhaltenen Spaltprodukte enthalten C-terminal entweder Homoserin oder Homoserinlacton, mit Ausnahme des C-terminalen Peptids. Die Sequenz Methionin-Methionin liefert freies Homoserinlacton.

Unter sauren Bedingungen werden auch Cysteinreste angegriffen, hierbei tritt aber keine Spaltung auf. Diese Nebenreaktion findet bei S-carboxymethylierten Präparaten nicht statt.

20 mg carboxymethyliertes Apoprotein werden in 4 ml 70 % Ameisensäure gelöst (bzw. suspendiert), 100 mg festes Bromcyan zugegeben und das Gefäß fest verschlossen. Bis zur völligen Lösung des Proteins ist die Suspension zu rühren. Die Reaktionsdauer beträgt bei Raumtemperatur 24 Stunden.

Nach Abschluß der Spaltung schließt sich eine Gefrier-trocknung an, die gleichzeitig das flüchtige Lösungsmittel und das Reagens entfernt. (Lagerung der Peptide unter Kühlung.)

Aufgrund der starken Giftwirkung und Flüchtigkeit des Bromcyans sind alle Operationen in einem gut ziehenden Abzug auszuführen.

4. Analytische und präparative Peptidtrennungen

4.1 Chromatographie an SEPHADEX G-100

20 - 50 mg Bromcyanpeptide bzw. gefriergetrocknetes carboxymethyliertes Apoprotein werden unter Rühren in 3 ml 50 % Essigsäure suspendiert. Durch Harnstoffzugabe geht das Material nach 2 - 3 Stunden völlig in Lösung.

Die Chromatographie erfolgt in 50 % Essigsäure an SEPHADEX G-100, das in dieser Lösung in geringerem Maße quillt als in verdünntem Puffer. Die Säulenmaße betragen 175 x 3 cm, die Durchflußgeschwindigkeit konstant 20 ml/h (elektronisch stabilisierte LKB-Varioperpex-Pumpe). Zur Registrierung des Durchflusses bei 255 nm dient das Durchflußphotometer UVICORD LKB 4701 A mit LKB Fallbügelschreiber 6520 A.

5 ml-Fractionen werden gesammelt, nach Abschluß der Chromatographie die Fraktionen der Peaks vereinigt und gefriergetrocknet (vor dem Einfrieren im Kältebad wird das Volumen mit dest. Wasser verdoppelt).

Zur Analyse der Trennergebnisse wird die kontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit 10 % Gelkonzentration bei pH 7 eingesetzt.

Die Peptide werden überwiegend in Gruppen mit hohem, mittlerem und niedrigem Molekulargewicht eluiert, was eine Rechromatographie der Fraktionen an entsprechend ausgesuchtem Trennmateriale erforderlich macht. Die erneute Chromatographie der leichten Peptide an SEPHADEX G-75 ergibt eine wesentliche Verbesserung der Trennung mit einer fast einheitlichen Peptidfraktion. Wegen der hohen Peptidverluste und der sauberen elektrophoretischen Trennung wurden die säulenchromatographischen Trennungen eingestellt.

4.2 Kontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen und Peptiden

Die Methode wurde von A.L.SHAPIRO, E.VINUELA und J.V. MAIZEL⁶⁰⁾ zur Molmassenbestimmung von Proteinen eingeführt, von K.WEBER und M.OSBORN³⁰⁾ und A.K.DUNKER und R.R.RUECKERT⁶¹⁾ weiterentwickelt und von H.FURTH-MAYR und R.TIMPL⁶²⁾ zur Trennung und Charakterisierung von Peptiden aus Kollagen eingesetzt. Die Genauigkeit liegt bei Molekülen mit Molmassen über 10 000 innerhalb 10 % Fehlergrenze. R.T.SWANK und K.D.MUNKES⁶³⁾ haben gezeigt, daß diese Methode auch zur Molekulargewichtsbestimmung von Oligopeptiden geeignet ist, aufgrund des größeren Einflusses der Eigenladung liegt die Fehlergrenze hier bei $\pm 18\%$.

4.2.1 Präparation der Protein- und Peptidlösungen

Zur Lösung und Adsorption von Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Präparate (1 - 2 mg) 2 Stunden bei 37°C in Phosphatpuffer, der je 1 % SDS und β -Mercaptoäthanol enthält, unter Stickstoff inkubiert. Falls erforderlich kann man die Löslichkeit durch Harnstoffzugabe verbessern. (Rühren mit Teflonrührfisch).

Inkubationspuffer: 0,01 M Natriumphosphatpuffer
pH 7,0

1 % SDS

1 % β -Mercaptoäthanol

(+) Harnstoff

Proteinkonzentration: 0,2 - 0,6 mg/ml

Der Inkubation folgt eine 6-stündige Dialyse in Ultra-
hülsen Nr. 100 (Schleicher und Schüll), die mithilfe
passender Schliffhalterungen in Waschflaschen einge-

setzt werden, gegen 500 ml Dialysierpuffer.

Dialysierpuffer:

0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0

0,1 % SDS

0,1 % β -Mercaptoäthanol

4.2.2 Präparation des SDS-Polyacrylamid-Gels

Lösungen für 10 % Gel:

Gelpuffer (0,2 M)

8,7 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a.

36,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a.

2,0 g SDS

ad 1000 ml H_2O dest.

Acrylamidlösung

22,2 g Acrylamid p.a.

0,6 g Methylenbisacrylamid p.a.

ad 100,0 ml H_2O dest.

Lösung zur Entfernung von unlöslichem Material
filtrieren.

Katalysatorlösung (stets frisch bereiten)

150,0 mg Ammoniumpersulfat p.a.

ad 100,0 ml H_2O dest.

N,N,N,N-Tetramethyl-äthylen-diamin (TEMED)

Die Trenngele werden in senkrecht aufgestellten, am
unteren Ende mit Gummistopfen verschlossenen, Glasröhr-

chen, 12 x 0,6 cm Innenmaße, Enden plan geschliffen, polymerisiert. Vor Gebrauch ist eine perfekte Reinigung der Röhrchen mit Chromschwefelsäure erforderlich, da bei SDS-Gelen sehr leicht Ablösung von der Glaswand eintritt.

Gelansatz

15,0 ml Gelpuffer
13,5 ml Acrylamidlösung
1,5 ml Persulfatlösung
0,03 ml TEMED

Die TEMED-Konzentration wird gegenüber den Literaturangaben (30) verringert, da die Lösung mit 0,045 ml zu schnell polymerisiert.

Gelpuffer und Acrylamidlösung werden gemischt, im Vakuum entlüftet (Vermeidung von Blasenbildung bei der Polymerisation) und danach Persulfatlösung und TEMED zugegeben.

Die Glasröhrchen füllt man mithilfe einer Injektions-spritze mit 15 cm langer Kanüle von unten her genau bis zu einer Eichmarke 2 cm unterhalb des oberen Endes luftblasenfrei mit Gellösung. Zur Ausbildung einer völlig glatten Geloberfläche ist vor Beginn der Polymerisation vorsichtiges Überschichten mit Wasser unumgänglich.

Die Polymerisation tritt je nach Raum- und Lösungstemperatur (Lösungen im Kühlschrank aufbewahren) innerhalb 5 - 10 Minuten unter starker Erwärmung ein, wodurch sich die Gele häufig bei der anschließenden Schrumpfung von der Glaswand geringfügig ablösen. Diese Gelsäulchen sind unbrauchbar, für eine 12-Säulenapparatursind deshalb mindestens 15 Röhrchen anzusetzen.

Kühlung durch kaltes Wasser verzögert zwar die Polymerisation, verbessert aber nicht die Haftung des Acrylamidgels an der Glaswand.

Nach vorsichtiger Entnahme der Gelröhrchen aus den Bohrungen der Gummistopfen werden die herausragenden Gelenden glatt abgeschnitten, das überstehende Wasser abgesaugt und die fertigen Säulchen in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt.

4.2.3 Durchführung der Elektrophorese

Probenvorbereitung

Pro Gelsäule werden aufgetragen:

10 - 50	µl	Proteinlösung
50	µl	Dialysierpuffer
5	µl	Mercaptoäthanol
3	µl	0,5 % Bromphenolblaulösung
1		Tropfen Glycerin

Es hat sich bewährt, die Proben in Mikroreagenzgläsern anzusetzen, die Lösung gut zu durchmischen, und erst nach Füllung der Elektrophoresekammern und Säulenenden mit Elektrophoresepuffer, die Proben durch Unterschichten des Puffers aufzutragen. Die Schichtung bleibt durch den Glycerinzusatz der Probenlösung stabil.

Elektrophoresepuffer

Als Elektrophoresepuffer wird Gelpuffer, 1 : 1 mit dest. Wasser verdünnt, eingesetzt. Die Phosphatkonzentration ist 0,1 M, der pH-Wert 7,0 .

Elektrophoresebedingungen

In der selbstgebauten Elektrophoreseapparatur sind 12 Trennsäulchen kreisförmig in 7,5 cm Abstand um die Platinelektroden angeordnet.

Obere Kammer: Kathode

untere Kammer: Anode

Mithilfe eines elektronisch stabilisierten Transformators werden zu Beginn der Elektrophorese für 20 Minuten 4 mA pro Gelsäule angelegt. Nach Konzentrierung der Proteine und Peptide an der Geloberfläche erhöht man die Stromstärke auf 8 mA. Die Spannung beträgt 60 - 90 V. Durchführung bei Zimmertemperatur.

Unter diesen Bedingungen wird der Marker etwa 1,1 cm pro Stunde zur Anode bewegt.

4.2.4 Fixierung und Färbung

Fixier- und Färbelösung

25,0 % Methanol p.a.

7,5 % Essigsäure p.a.

0,5 % Amidoschwarz 10 B

67,0 % H₂O dest.

Die Acrylamidgele werden nach der Elektrophorese vorsichtig mithilfe eines genau passenden Spritzenkolbens aus den Glasröhrchen direkt in die Fixier- und Färbelösung gedrückt. Der Druck muß genau dosiert sein und stetig wirken, da die Gele sonst leicht völlig zerreißen. Bei richtigem Vorgehen von der Anodenseite her wird nur etwa 1 cm des Gelendes zerstört. Die Geloberfläche bleibt glatt, sodaß die densitometrische Auswertung nicht gestört wird.

Färbedauer: 2 Stunden

Nach Färbung und Fixierung entfernt man den größten Teil des überschüssigen Farbstoffs durch Überführung der Gelsäulchen in Entfärbelösung.

Entfärbe- und Aufbewahrungslösung

25,0 % Methanol p.a.

7,5 % Essigsäure p.a.

67,5 % H₂O dest.

In dieser Lösung bleiben die Gele am besten über Nacht. Die endgültige Entfärbung der peptid- und proteinfreien Gelabschnitte erfolgt mit der gleichen Lösung in einseitig verengten Glasröhrchen im elektrischen Feld der Elektrophorese-Apparatur bei einer Stromstärke von 12 mA pro Säulchen in etwa 3 Stunden.

Bei der gewählten Fixierungs- und Entfärbemethode treten keine Schrumpfungen oder Quellungen des Polyacrylamidgels ein. Die Gele werden in der Entfärbelösung lichtgeschützt aufbewahrt.

4.2.5 Auswertung

Die Auswertung der Pherogramme erfolgt durch Messung der Laufstrecken von Marker und Peptid- bzw. Proteinbanden und durch densitometrische Vermessung der Säulchen bei 684 nm, dem Absorptionsmaximum von Amidoschwarz, über die gesamte Länge. Ein Densitometerzusatz (Hersteller ERDMANN u. GRÜN, Wetzlar, nach einem Muster aus dem Arbeitskreis von Prof.F.Schneider) zum ZEISS PMQ II Spektralphotometer mit lin/log-Wandler und Schreiber dient zur Aufnahme der Extinktionskurven. Zur Ermittlung der Molmassen werden für die einzelnen Banden die Quotienten aus ihrer Laufstrecke und der Laufstrecke des Markers (relative Mobilität)

errechnet. Trägt man die Mobilität von Eichproteinen gegen den dekadischen Logarithmus ihrer Molmassen graphisch auf, so liegen diese Werte auf einer Geraden, die als Eichkurve zur graphischen Ermittlung der Molmassen von Peptiden und Proteinen dient.

Die densitometrische Vermessung erlaubt neben der genauen Feststellung der Laufstrecke auch die quantitative Bestimmung der Protein- und Peptidfraktionen nach der H x W -Methode.

4.2.6 Färbung von Proteinen und Peptiden mit Fluoreszenzfarbstoff

B.K.HARTMAN und S.UDENFRIED⁴⁷⁾ entwickelten eine Methode zur unmittelbaren Sichtbarmachung von Proteinen und Polypeptiden in Polyacrylamidgel.

1-Anilinonaphthalin-8-sulfonsäure-Mg (ANS) fluoresziert in organischen Lösungsmitteln nicht aber in Wasser. In wässriger Proteinelösung tritt durch Adsorption an hydrophobe Bereiche des Proteins Fluoreszenz auf.

Eine Vorratslösung mit 1 mg ANS/ ml Wasser kann bei 4°C bis zu einem halben Jahr gelagert werden. Durch Verdünnen mit 0,1 N Natriumphosphatpuffer pH 6,8 auf eine Endkonzentration von 0,003 % ANS erhält man die Färbelösung.

Bei Überführung der frischen Gelsäulchen in die Färbelösung erscheinen unter der UV-Lampe die Proteine nach 1 - 3 Minuten als gelb fluoreszierende Bänder. Eine Entwässerung des Gels erhöht bei geringer Proteinkonzentration die Empfindlichkeit. Das Gel kann zur Denaturierung des Proteins und Verbesserung der Färbung

über konz. HCl gehalten oder bis zu 2 Minuten in 3 N HCl überführt werden.

Diese Methode ist bei ausreichend hydrophobem Charakter der Proteine für Banden bis 20 µg geeignet. In der SDS-Elektrophorese bleiben schwächere Banden leider unsichtbar, da der hydrophobe Charakter der Proteine und Peptide durch die Adsorption von SDS überwiegend verlorengeht.

4.3 Präparative Peptidtrennung durch kontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Allgemeine Prinzipien der präparativen Peptidtrennung durch SDS-Elektrophorese habe ich bereits in Teil I, Kap. 5.3 beschrieben.

4.3.1 Trennungsverfahren

Die Methode zur Molekulargewichtsbestimmung wird nach Vorversuchen über den Einfluß der Inkubation mit 1 % SDS- und β -Mercaptoäthanol-haltigem Phosphatpuffer entsprechend den Erfordernissen abgewandelt. Die Inkubation und Dialyse entfallen, ebenso der Mercaptoäthanolzusatz in den Probenlösungen, da die Peptide S-carboxymethyliert vorliegen, und Mercaptoäthanol keinen Einfluß auf die Trennung hat.

Die Peptide werden in Gelpuffer gelöst, bei jeder Trennung 0,5 mg Peptide pro Säulchen, Maße (innen) 10 x 0,6 cm, aufgetragen. Stabilisierung der Proben durch je 1 Tropfen Glycerin, Arbeitsweise wie bei Methode zur Molmassenbestimmung beschrieben. Die Stromstärke beträgt in den ersten 20 Minuten der Elektrophorese 4 mA, danach 8 mA pro Säulchen. Die Trennung wird beendet, wenn der Marker nach 5 Stun-

den eine Marke bei 5,5 cm Trennstrecke erreicht hat. Bei 8 mA/Säulchen beträgt die Spannung zwischen den Elektroden 60 - 90 Volt, die Belastung liegt damit zwischen 0,5 - 0,75 Watt - unter diesen Bedingungen reicht die Luftkühlung bei der Elektrophorese noch aus.

4.3.2 Identifizierung der Peptidbanden

Die Standardisierung der Arbeitsbedingungen ist zur Erreichung konstanter Laufstrecken im Hinblick auf Lokalisation und Isolierung der Peptide unabdingbare Voraussetzung der Methode. Selbst Unterschiede in der aufgetragenen Probenmenge führen in der kontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese zu Veränderungen der Laufstrecken.

Die Peptidbanden werden mithilfe eines gefärbten Säulchens aus jeder Trennung lokalisiert, herausgeschnitten und gefroren gesammelt. Die Methode muß durch unmittelbare reversible Färbung jedes Säulchens verbessert werden, damit auch dicht zusammenliegende Fraktionen getrennt bleiben.

V.NEUHOFF⁴⁹⁾ färbt seine Microsäulchen der Disc-Elektrophorese direkt mit Bromphenolblau-Lösung und schneidet die Enzymbanden dann unter dem Stereomikroskop heraus. Dieses Verfahren gelingt im Anschluß an die SDS-Gelelektrophorese nicht, da der Farbstoff nicht ausreichend von den Polypeptiden adsorbiert wird.

4.3.3 Elution der Peptide

Die sorgfältige Zerkleinerung des Gels ist Voraussetzung für eine ausreichende Elution der Peptide, da sehr große Moleküle in 10 % Acrylamidgel nur geringfügig diffundieren können.

Die gefrorenen Gelscheibchen werden in eine Injektionsspritze gefüllt und durch kräftige Kompression mit dem Kolben in wenig 0,1 N HCl gedrückt, dabei zerreißt das Gel und nach mehreren Passagen durch immer feinere Kanülen schließt sich die Elution der Peptide mit 0,1 N HCl an.

Die Elution in 0,1 N HCl soll durch Quellung des Gels und Protonierung der Peptide die quantitative Ausbeute verbessern. Das zerkleinerte Material wird 3 mal mit dem 50-fachen Volumen Salzsäure unter ständigem Rühren extrahiert, Dauer 3, 6 und 12 Stunden. Die ebenfalls extrahierte, geringfügige Menge Natriumphosphat und das SDS stören die Aminosäureanalysen nicht. Die von K.WEBER und M.OSBORN³⁰⁾ beschriebene Elution von nativen Enzymen mit SDS-Lösung und anschließender Acetonfällung des Proteins, wobei der überwiegende Teil des SDS in Lösung bleibt, bewährt sich bei den S-carboxymethylierten Peptiden nicht.

Die eluierten Fraktionen werden am Rotavapor eingengt, im Exsikkator über NaOH getrocknet und entsprechend der Arbeitsvorschrift der sauren Hydrolyse zugeführt.

5. Quantitative Aminosäurenanalyse

Hydrolyse, Chromatographie und Auswertung zu den Aminosäureanalysen werden weitgehend nach der Bedienungsanleitung zum BECKMAN MULTICHROM 4255 ausgeführt. Einzelheiten über Pufferlösungen, Ninhydrinreagenz und technische Details sind dort zu finden. Die Anleitung enthält ferner einen Literaturanhang zu allen Problemen der Aminosäurenanalyse, auf den ich hier verweise.

5.1 Saure Hydrolyse

0,5 - 1,5 mg gefriergetrocknete Proteine oder Peptide werden in Hydrolysekölbchen (einige Tage zur Entfernung der aus der Glasoberfläche lösbaren Schwermetallionen in 2 N HCl spülen) mit 1 ml 5,7 N HCl p.a., 1 Tropfen β -Mercaptoäthanol und einigen Phenolkristallen versetzt.

Mithilfe einer Kapillare läßt man nachgereinigten Stickstoff 15 Minuten lang unter Vermeidung von Schaumbildung zur Austreibung von Sauerstoff durch die Lösung perlen.

Durch Eintauchen in ein Trockeneis-Alkoholbad friert die Probenlösung bei verstärktem N_2 -Strom ein. Nach kurzem Evakuieren (Wasserstrahl- oder Vakuumpumpe) wird der Hals der Kölbchen zugeschmolzen.

Zur quantitativen Erfassung der Gehalte an Serin, Threonin, Valin und Isoleucin werden von jedem Präparat mindestens 2 Hydrolysen von unterschiedlicher Dauer, hier 20 und 50 Stunden, bei 110°C durchgeführt.

Die Hydrolysate sind im Kühlschrank ohne merklichen Verlust kurzzeitig lagerfähig. Bei sichtbarer Huminbildung ist die Lösung nach dem Öffnen der Hydrolysekölbchen zu filtrieren oder zentrifugieren. Die zur Hydrolyse eingesetzte HCl verflüchtigt sich im evakuierten Exsikkator über festem NaOH innerhalb eines Tages restlos.

5.2 Chromatographie

Die hydrolysierten Substanzen löst man in 1 - 2 ml Probenverdünnungspuffer (0,2 N Natriumcitratpuffer pH 2,2 + Zusätze), überführt die Lösung in ein ver-

schließbares Gefäß und kann sie so gefroren aufbewahren. Zur Durchführung einer Analyse sind je nach Methode und Substanzeinwaage 0,2 - 1 ml der Lösung erforderlich. Die Probeneingabe erfolgt mithilfe einer gasdichten Spritze über den automatischen Probengeber.

Die angewandten Methoden richten sich nach den verfügbaren Substanzmengen: Zweisäulenverfahren an 9 mm-Säulen aufgrund der größeren quantitativen Zuverlässigkeit bei ausreichend verfügbarem Apoprotein, Einsäulenverfahren an der langen Säule mit 16 mm Durchflußküvette und einem Coil von 30 m Länge zur Erhöhung der Empfindlichkeit bei den Peptiden. Die Erfassungsgrenze beträgt dann ca. $5 \cdot 10^{-9}$ Mol/Aminosäure. Einzelheiten sind den beigegeführten Datenblättern zu entnehmen.

5.3 Auswertung

Zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung der Aminosäuren dienen Vergleichschromatogramme von BECKMAN-Aminosäuretestgemisch, das die wichtigsten, gegen saure Hydrolyse stabilen, Aminosäuren enthält. Zur Bestimmung von S-carboxymethyliertem Cystein, das sich aufgrund seines sauren Charakters vor Asparaginsäure vom Austauschler löst, fügt man dem verdünnten Testgemisch 0,5 $\mu\text{Mol/ml}$ von dieser Aminosäure bei. Ebenso werden weitere Substanzen, hier Galaktosamin, bestimmt.

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgt manuell durch Messung der Peakhöhe und Auszählung der vom Schreiber gesetzten Punkte der oberen Peakhälfte nach der H x W-Methode. Aus Testgemischanalysen ermittelte Konstanten für jede Aminosäure erlauben die Umrechnung der H x W-Werte in μMol Aminosäure nach der Gleichung:

$$\mu\text{Mol As} = \frac{H \cdot W}{C_{\text{HW}}}$$

H = Peakhöhe

W = Peakbreite (Zahl der Punkte)

C_{HW} = Konstante der Aminosäure

Die Werte von Serin und Threonin werden mithilfe der 20- und 50-Stunden-Hydrolyseergebnisse graphisch auf den Zeitpunkt 0 extrapoliert, um die Hydrolyseverluste auszugleichen. Bei Valin und Isoleucin gelten die höheren Werte der 50-Stunden-Hydrolyse aufgrund der Beständigkeit ihrer Peptidbindungen.

MULTICHROM
Flüssigkeits -
Säulenchromatograph

DATENBLATT (A)

Chromatogramm Nr.: 3
Datum : 27. 12. 1975
Analysen Nr. : 3
Operator : Mätzke
Auswertungsmethode : manuell

Probe:	S-carboxymethyliertes Apoprotein Mandel Iso II
Probenmenge in ml Gesamtvolumen:	2,0
Probenmenge in ml aufgetragen:	0,5

Säule :	lang Ø 9 mm	Puffer 1 :	0,2 N Na-Citrat pH 3,22
Coil :	20 m	Puffer 2 :	0,2 N Na-Citrat pH 4,25
Harztyp :	BECKMAN M 82	Puffer 3 :	—
Füllhöhe :	56,5 cm	Puffer 4 :	—
Temp. 1 :	55°C	Puffer 5 :	—
Temp. 2 :	—	Regenerierreagens :	0,2 N NaOH
Temp. 3 :	—	Pufferdurchfluß :	70 ml/h
Temp. Gradient :	—	Ninh.- Durchfluß :	35 ml/h
Küvette :	10 mm	Schreiberbereich :	0 - 100 mV
		Ninhydrin:	2... Tage alt

Programm :

Puffer 1	Puffer 2	Puffer 3	Puffer 4	Puffer 5
<u>190</u>	<u>115</u>	<u>989</u>	<u>989</u>	<u>989</u>
<u>989</u>	<u>989</u>	<u>180</u>	<u>195</u>	<u>230</u>
Temp. 2	Temp. 3	Regen.	Recorder Ninh. Temp. 1	Reset

Bemerkungen: Zweisäulenverfahren
Trennung der sauren und neutralen Aminosäuren

MULTICHROM
Flüssigkeits -
Säulenchromatograph

DATENBLATT (A)

Chromatogramm Nr.: 4
Datum : 27. 12. 1975
Analysen Nr. : 4
Operateur : Mätzke
Auswertungsmethode : manuell

Probe: S-carboxymethyliertes Apoprotein Mandel Iso II
Probenmenge in ml Gesamtvolum.: 2,0
Probenmenge in ml aufgetragen : 0,5

Säule :	kurz Ø 9 mm	Puffer 1 :	0,35 N Na-Citrat pH 5,28
Coil :	20 m	Puffer 2 :	—
Harztyp :	BECKMAN M 71	Puffer 3 :	—
Füllhöhe :	6 cm	Puffer 4 :	—
Temp. 1 :	55°C	Puffer 5 :	—
Temp. 2 :	—	Regenerierreagens :	0,2 N NaOH
Temp. 3 :	—	Pufferdurchfluß :	70 ml/h
Temp. Gradient :	—	Ninh.- Durchfluß :	35 ml/h
Küvette :	10 mm	Schreiberbereich :	0 - 100 mV
		Ninhydrin:	2... Tage alt

Programmi :

Puffer 1	Puffer 2	Puffer 3	Puffer 4	Puffer 5
<u>060</u>	<u>989</u>	<u>989</u>	<u>989</u>	<u>989</u>
<u>989</u>	<u>989</u>	<u>055</u>	<u>065</u>	<u>090</u>
Temp. 2	Temp. 3	Regen.	Recorder Ninh. Temp. 1	Reset

Bemerkungen: **Zweisäulenverfahren**
Trennung der basischen Aminosäuren

Chromatogramm Nr.: 11
Datum : 29. 12. 1975
Analysen Nr. : 11
Operateur : Mätzke
Auswertungsmethode : manuell

Probe: Peptid Nr. 2 (Mandel Iso II)
Probenmenge in ml Gesamtvolum.: 1,0
Probenmenge in ml aufgetragen : 0,4

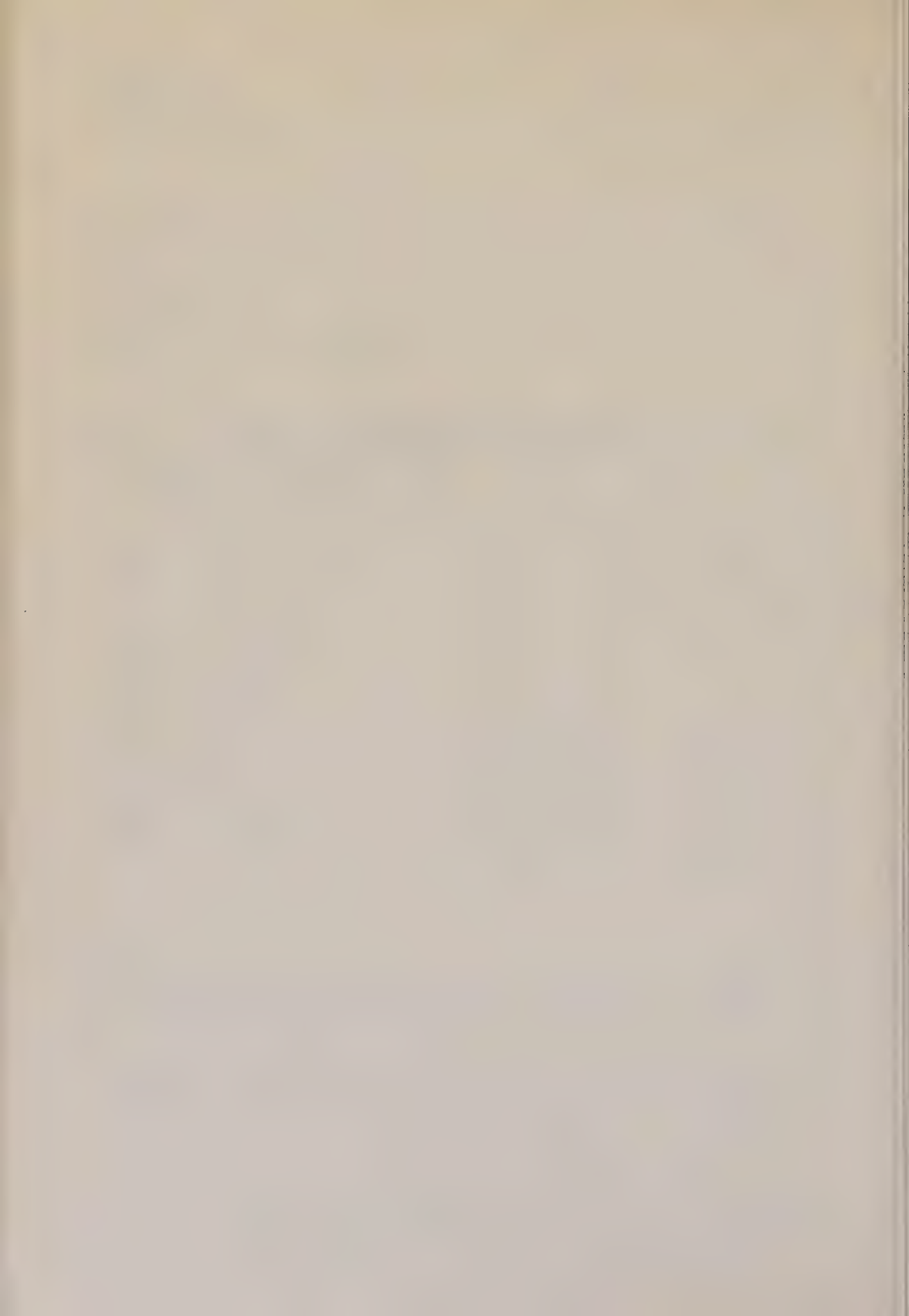
Säule :	lang Ø 9mm	Puffer 1 :	0,2 N Na-Citrat pH 3,22
Coil :	30 m	Puffer 2 :	0,2 N Na-Citrat pH 4,25
Harztyp :	BECKMAN M 82	Puffer 3 :	1,2 N Na-Citrat pH 6,25
Füllhöhe :	55,5 cm	Puffer 4 :	—
Temp. 1 :	55°C	Puffer 5 :	—
Temp. 2 :	—	Regenerierreagens :	0,2 N NaOH
Temp. 3 :	—	Pufferdurchfluß :	100 ml/h
Temp. Gradient :	—	Ninh.- Durchfluß :	50 ml/h
Küvette :	16 mm	Schreiberbereich :	0 - 100 mV
		Ninhydrin:	4..... Tage alt

Programm :

Puffer 1	Puffer 2	Puffer 3	Puffer 4	Puffer 5
<u>190</u>	<u>080</u>	<u>100</u>	<u>989</u>	<u>989</u>
<u>989</u>	<u>989</u>	<u>180</u>	<u>195</u>	<u>215</u>
Temp. 2	Temp. 3	Regen.	Recorder Ninh. Temp. 1	Reset

Bemerkungen: Einsäulenverfahren
Trennung der sauren, neutralen und basischen
Aminosäuren

III Literaturverzeichnis



Literaturverzeichnis

- 1) ROSENTHALER, L.: Biochem. Z. 14, 235 (1908)
- 2) NORDEFELDT, E.: Biochem. Z. 118, 15 (1921)
Biochem. Z. 159, 1 (1925)
- 3) ALBERS, H. et al.: Biochem. Z. 269, 26, 35, 43
(1934)
- 4) BENTHIN, U.: Diplomarbeit (Marburg) 1958
Dissertation (Marburg) 1959
- 5) ESCHENHOF, E.: Diplomarbeit (Marburg) 1961
Dissertation (Marburg) 1962
- 6) BECKER, W.: Diplomarbeit (Marburg) 1962
Dissertation (Marburg) 1964
- 7) GERSTNER, E. und PFEIL, E.: Hoppe-Seyler's Z.
Physiol. Chem. 353, 271 (1972)
- 8) BECKER, W. und PFEIL, E.: Biochem. Z. 346, 301
(1966).
- 9) GERSTNER, E., MÄTZKE, V. und PFEIL, E.: Natur-
wissenschaften 55, 561 (1968)
- 10) MÄTZKE, V.: Staatsexamensarbeit (Marburg)
1968
- 11) MANTEL, M.: Staatsexamensarbeit (Marburg)
1968
- 12) ASCHOFF, H.-J. und PFEIL, E.: Hoppe-Seyler's Z.
Physiol. Chem. 551, 818 (1970)
Dissertation (Marburg) 1968
- 13) STEINER, I.: Staatsexamensarbeit (Marburg)
1973
- 14) WAGNER, R.: Staatsexamensarbeit (Marburg)
1973
- 15) KROMBHOLZ, F.: Staatsexamensarbeit (Marburg)
1966

- 16) HAAS,G.: Dissertation (Marburg) 1976
- 17) WIELAND,T. und PFLEIDERER,G.: Biochem. Z. 329,
112 (1957)
- 18) IUPAC-IUB COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMEN-
CLATURE (CBN): Hoppe-Seyler's
Z. Physiol. Chem. 353, 852 (1972)
- 19) MEHNER,K-H.: Staatsexamensarbeit (Marburg)
1971
- 20) STRITTMATTER,P.: J. Biol.Chem. 236, 2329 (1961)
- 21) NEUMAN,H., GOLDBERGER,R.F. und SELA,M.: J. Biol.
Chem. 239, 1536 (1964)
- 22) CRESTFIELD,A.M., MOORE,S. und STEIN,W.H.:
J. Biol. Chem. 238, 622 (1963)
- 23) WANG,S. und CARPENTER,F.H.: J. Biol. Chem.
240, 1619 (1965)
- 24) CANFIELD,R.E.: J. Biol. Chem. 238, 2691 (1963)
- 25) KIMMEL,J.R., KATO,G.K., PAIVA,A.C.M. und
SMITH, E.L.: J. Biol. Chem.
237, 2525 (1962)
- 26) RUDLOFF,V.und BRAUNITZER,G.: Hoppe-Seyler's Z.
Physiol. Chem. 323, 129 (1961)
- 27) BENSON,J.V., JONES,R.T., CORMICK,J. und PATER-
SON,J.A.: Anal. Biochem. 16,
91 (1966)
- 28) GROSS,E. und WITKOP,B.: J. Am. Chem. Soc. 83,
1510 (1961)
- 29) ANFINSEN,C.B. et al.: J. Biol. Chem. 240,
2478 (1965)
- 30) WEBER,K. und OSBORN,M.: J. Biol. Chem. 244,
4406 (1969)
- 31) MENZEL,R.: Staatsexamensarbeit (Marburg)
1971

- 32) FLOSDORF, E.W.: Freeze-drying, Reinhold,
New York 1949
- 33) v.d.BERG, L. und ROSE, D.: Arch. Biochem. Bio-
phys. 81, 319 (1959)
- 34) EVERSE, J. und STOLZENBACH, F.E.: Methods in
Enzymology vol XXII, 33 (1971)
- 35) PARTRIDGE, S.M. und DAVIS, H.F.: Nature 165,
62 (1950)
- 36) LEACH, S.J.: Revs. Pure and Appl. Chem.
(Australia) 3, 25 (1953)
- 37) BLACKBURN, S. und LEE, G.R.: Biochem. J. 58,
227 (1954)
- 38) SCHULTZ, J., GRANNIS, G., KIMMEL, H. und SHAY, H.:
Federation Proc. 16, 244 (1957)
- 39) GRANNIS, G.F.: Arch. Biochem. Biophys. 91,
255 (1960)
- 40) WITKOP, B.: Advances in Protein Chem. 16,
221 (1961)
- 41) NELSON, C.A.: J. Biol. Chem. 246, 3895 (1971)
- 42) DUNKER, A.K. und RUECKERT, R.R.: J. Biol. Chem.
244, 5074 (1969)
- 43) SANGER, F. und THOMPSON, E.O.P.: Biochim. Bio-
phys. Acta 71, 468 (1963)
- 44) SIMPSON, J.R., NEUBERGER, M.R. und LIU, T.-Y.:
J. Biol. Chem. 251, 1936 (1976)
- 45) BECKMAN INSTRUMENTS, Bedienungsanleitung zum
MULTICHROM 4255, München o.J.
- 46) HICKS, G.P. und UPDIKE, S.J.: Anal. Chem. 38,
726 (1969)
- 47) HARTMAN, B.K. und UDENFRIEND, S.: Analyt. Bio-
chem. 30, 391 (1969)

- 48) NEUHOFF, V., SCHILL, W.-B. und STERNBACH, H.:
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.
Chem. 350, 767-774 (1969)
NEUHOFF, V.: Biol. i. u. Zeit 1, 19 (1971)
- 49) NEUHOFF, V. und SCHILL, W.-B.: Hoppe-Seyler's
Z. Physiol. Chem. 349, 795
(1968)
- 50) CRANE, M.B. und LAWRENCE, W.J.C.: The Genetics
of Garden Plants, Macmillan +
Co., Ltd., London 1938
- 51) KITTO, G.B., WASSARMAN, P.M. und KAPLAN, N.O.:
Proc. Natl. Acad. Sci., Wash.
56, 578 (1966)
- 52) WILKINSON, J.H.: Isoenzymes, Chapman + Hall,
London 1970, 2nd ed.
- 53) KIERSZENBAUM, F., LEVISON, S.A. und DANDLIKER, W.B.:
Anal. Biochem. 28, 563 (1969)
- 54) KISSLINGER, M.: Dissertation (Marburg) 1974
- 55) ORNSTEIN, L.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 121,
321 (1964)
- 56) DAVIS, B.J.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 121,
404 (1964)
- 57) GERSTNER, E.: Dissertation (Marburg) 1970
- 58) HELLERMAN, L., CHINARD, F.P. und DEITZ, V.R.:
J. Biol. Chem. 147, 443 (1943)
- 59) BOYER, P.D.: J. Am. Chem. Soc. 76, 4331
(1954)
- 60) SHAPIRO, A.L., VINUELA, E. und MAIZEL, J.V., Jr.:
Biochem. Biophys. Res. Commun.
28, 815 (1967)
- 61) DUNKER, A.K. und RUECKERT, R.R.: J. Biol. Chem.
244, 5074 (1969)

- 62) FURTMAYR, H. und TIMPL, R.: Anal. Biochem.
41, 510 (1971)
- 63) SWANK, R.T. und MUNKRES, K.D.: Anal. Biochem.
32, 462 (1971)

Meinem sehr verehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. Emanuel Pfeil,

danke ich für seine Unterstützung und das stete Interesse, das er mir bei der Durchführung dieser Arbeit entgegengebracht hat.

Meine akademischen Lehrer waren:

Abendroth, Aurich, Becker, Berndt, Buchholtz,
Cleffmann, Dehnicke, Dimroth, Döpp, Dorer, Drawert,
Ebbinghaus, Follmann, Froese, Gerstner, Geyer,
Hellner, Henssen, Hoffmann, Karlson, Kating, Kell-
ner, Kessel, Kirmse, Koch, Koecke, Kuhn, Lenski,
Lorberth, Ludwig, Lüdtke, Mahr, Maier, Matthes,
Matthias, Maus, Musso, Nöth, Nultsch, Pfeil, Reich,
Reichardt, Schneider, Seidel, Seidelmann, v. Stosch,
Walcher, Wendt, Witzel.

Lebenslauf

von Werner Walter Volker Mätzke

12. 2. 1943 geboren in Kassel als Sohn des Reichsbahnbeamten Walter Mätzke und seiner Ehefrau Martha, geb. Dietzel
- 1949 - 1953 Besuch der Volksschule in Kassel
- 1953 - 1962 Schüler der Wilhelmschule in Kassel
26. 2. 1962 Reifeprüfung
- 1962 - 1969 Studium der Erziehungswissenschaften, Biologie und Chemie in Marburg/L.
1. 2. 1966 Prüfung in Erziehungswissenschaften und Politik
16. 6. 1969 Wiss. Prüfung in Chemie und Biologie für das Lehramt an Gymnasien in Marburg/L.
23. 7. 1969 Heirat mit Gertraude Ullrich aus Kassel
5. 9. 1969 Einstellung als Studienreferendar in Kassel
9. 7. 1970 Zweite Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien
1. 8. 1970-
31. 7. 1974 Verwalter einer wiss. Assistentenstelle am Institut für Organische Chemie bzw. wissenschaftlicher Angestellter im Fachbereich Chemie der Philippsuniversität Marburg
6. 3. 1973 Geburt von Tochter Anja
1. 8. 1974 Einstellung als Studienrat am Oberstufengymnasium des Landkreises Kassel in Kassel-Obzw.
- 1972 - 1975 Durchführung der experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. Pfeil

